EINFLUSS VON METHYLENBLAU, DIAMID UND t-BUTYLHYDROPEROXID AUF DIE SEKRETION VON INSULIN AUS ISOLIERTEN LANGERHANS'SCHEN INSELN DES RATTENPANKREAS

Ein Beitrag zur Erkennung der Bedeutung von NADPH und reduziertem Glutathion für den Sekretionsmechanismus

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Herbert Niklas
aus Augsburg

1978

EINFLUSS VON METHYLENBLAU, DIAMID UND t-BUTYLHYDROPEROXID AUF DIE SEKRETION VON INSULIN AUS ISOLIERTEN LANGERHANS'SCHEN INSELN DES RATTENPANKREAS

Ein Beitrag zur Erkennung der Bedeutung von NADPH und reduziertem Glutathion für den Sekretionsmechanismus

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Herbert Niklas
aus Augsburg

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Juni 1978
Dekan: Prof. Dr. H. Auterhoff
1. Berichterstatter: Prof. Dr. H.P.T. Ammon
2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Reinhard

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen, Abteilung Pharmakologie, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H.P.T. Ammon in der Zeit von Oktober 1974 bis Mai 1978 angefertigt.

Herrn Prof. Dr. H.P.T. Ammon
danke ich für das stete Interesse und die freundliche Unterstützung am Fortgang dieser Arbeit.

Abkürzungen

6-AN	6-Aminonicotinamid
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
t-BHP	tert.-Butylhydroperoxid
c-AMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
µE	Mikroeinheiten
F-6-P	Fructose-6-phosphat
F-1,6-PP	Fructose-1,6-biphosphat
G-6-P	Glucose-6-phosphat
G-6-P-DH	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
GSH	Glutathion (reduzierte Form)
GSSG	Glutathion (oxidierte Form)
IRI	immunoreaktives Insulin
KRB-Lösung	Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung
MB	Methylenblau
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH	reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
NADPH	reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
P_i	anorganisches Phosphat
6-PG	6-Phosphogluconat
p-CMB	p-Chloromercuribenzoat

PPS	Pentosephosphatshunt
S.D.	Standardabweichung
SEM.	mittlerer Fehler des Mittelwertes

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1.	Stand der Forschung	1
1.2.	Fragestellung	6
2.	Methodik	13
2.1.	Versuchstiere	13
2.2.	Material	14
2.2.1.	Chemikalien	14
2.2.2.	Nährlösungen	14
2.2.2.1.	Hank's Lösung	14
2.2.2.2.	Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung	15
2.3.	Experimenteller Teil	16
2.3.1.	Operation	16
2.3.2.	Isolierung der Langerhans'schen Inseln nach Lacy und Kostianovsky	17
2.3.3.	Herstellung von KRB-Lösungen für die Inkubation der Inseln	18
2.3.4.	Vorinkubation	19
2.3.5.	Hauptinkubation	19
2.3.6.	Radioimmunologische Bestimmung von Insulin	20
2.3.7.	Versuchsauswertung	22
2.3.8.	Einfluß von Diamid und t-BHP auf den Radioimmunoassay	23
3.	Versuchsergebnisse	26
3.1.	Glucose induzierte Insulinsekretion	26
3.2.	Einfluß von Methylenblau auf die Insulinsekretion	26
3.2.1.	Stimulation mit Tolbutamid	26

3.2.2.	Stimulation mit Arginin	29
3.2.3.	Stimulation mit Leucin	32
3.2.4.	Stimulation mit Aminophyllin	32
3.3.	Einfluß von Diamid auf die Insulinsekretion	35
3.3.1.	Dosis-Wirkungs-Kurve von Diamid	35
3.3.2.	Stimulation mit Glucose	38
3.3.3.	Stimulation mit Tolbutamid	40
3.3.4.	Stimulation mit Arginin	40
3.3.5.	Stimulation mit Leucin	40
3.3.6.	Stimulation mit Aminophyllin	44
3.4.	Einfluß von t-BHP auf die Insulinsekretion	44
3.4.1.	Stimulation mit Glucose	46
3.4.2.	Stimulation mit Tolbutamid	49
3.4.3.	Stimulation mit Arginin	49
3.4.4.	Stimulation mit Leucin	49
3.4.5.	Stimulation mit Aminophyllin	53
4.	Diskussion	55
4.1.	Darstellung der Literatur zur Insulin freisetzenden Wirkung von Tolbutamid, Arginin, Leucin und Aminophyllin	55
4.1.1.	Tolbutamid	56
4.1.2.	Arginin und Leucin	59
4.1.3.	Aminophyllin	61
4.2.	Einfluß von Methylenblau auf die Sekretion von Insulin	63
4.3.	Einfluß von Diamid und t-BHP auf die Sekretion von Insulin	67
5.	Zusammenfassung	75
	Literaturverzeichnis	78

1. EINLEITUNG

1. 1. Stand der Forschung

Der Mechanismus, über den die Langerhans'sche Insel das Signal zur Insulinfreisetzung aufnimmt und die Sekretion von Insulin veranlaßt, ist bis heute unklar geblieben. Neben der Notwendigkeit verschiedener Ionen, wie Na^+, K^+ (1), Ca^{2+}, Mg^{2+} (2) und das Vorhandensein von Energie in Form von ATP (3) ist vor allem der Glucose - als dem wichtigsten und potentesten physiologischen Stimulus - viel Aufmerksamkeit geschenkt worden. Im wesentlichen kann dabei von drei Theorien ausgegangen werden:

1. Die Glucose setzt im Laufe ihres Abbaues in der ß-Zelle ein Signal durch Bildung eines "Signalmetaboliten", der seinerseits den Sekretionsmechanismus in Gang setzt (4-6).
2. Das Glucosemolekül reagiert als solches mit einem hypothetischen Rezeptor, über den die Sekretion ausgelöst wird (7).
3. Rezeptortheorie + Glucosemetabolismus (Cofaktoren) sind für die Sekretion von Insulin von Bedeutung (8).

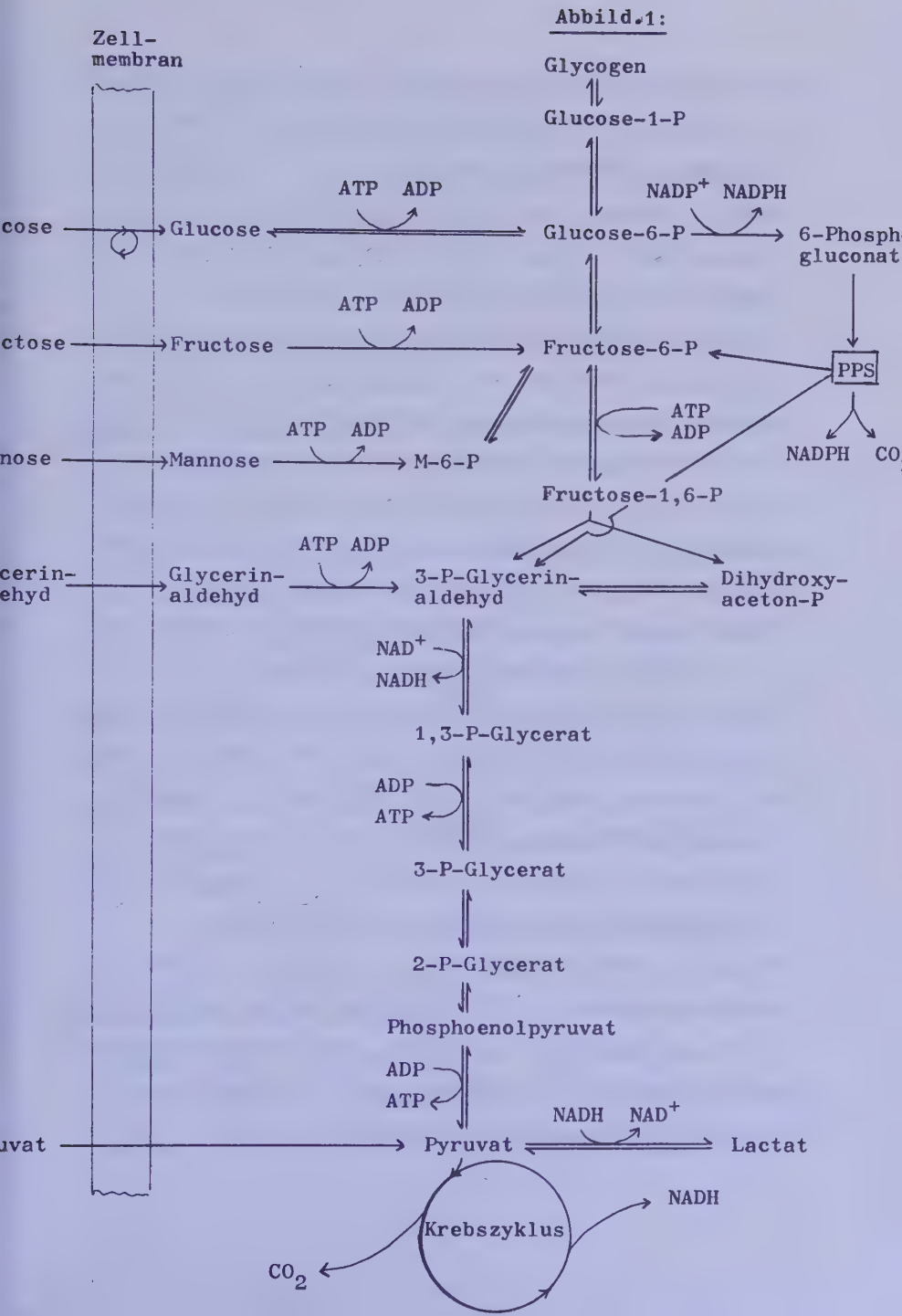
Für jede dieser drei Möglichkeiten gibt es unterstützende Belege (9).

Daß der Metabolismus der Glucose für die Sekretionsantwort wichtig ist, gründet sich unter anderem auf folgende Befunde: Zwischen der Glucose-Utilisation und ihrer Fähigkeit Insulin freizusetzen, besteht eine enge Korrelation (6). Hemmt man die Phosphorylierung der Glucose mit Mannoheptulose oder 5-Thio-D-Glucose, hemmt man auch die Freisetzung von Insulin (5). Desweiteren führt Desoxyglucose, von der man weiß, daß sie die Glycolyse im Schritt G-6-P zu F-6-P hemmt, zu einer Hemmung der Insulinsekretion. Metaboliten des Glucoseabbaues, wie 1,3-Dihydroxyaceton oder D-Glycerinaldehyd lösen auch ohne Glucose eine Insulinfreisetzung aus (10). Es wurde daher vermutet, daß das Signal im biochemischen Abbau unterhalb der Stufe des Fructose--1,6-diphosphats kommen muß. Auch der Gehalt der Insel an Phosphoenolpyruvat steigt mit der Glucosekonzentration an. Dieser Effekt konnte durch Mannoheptulose aufgehoben werden. Keinen Einfluß hatte Mannoheptulose dagegen auf den Anstieg von Phosphoenolpyruvat bei Stimulation mit Glycerinaldehyd (11) (siehe auch Abb. 1).

Gegen die Metabolittheorie spricht, daß nach Zufuhr von Glucose der Anstieg der Konzentration ihrer Metaboliten, wie G-6-P, 6-PG, F-1,6-PP dem Beginn der Insulinsekretion zeitlich nachhängt (7).

Für die Theorie, daß das Signal für die Insulinfreisetzung die Interaktion des Glucosemoleküls mit einem

Abbild.1:


Zell-
membran
Glycogen
Glucose-1-P
ATP ADP
NADP+ NADPH
cose
Glucose
Glucose-6-P
6-Phosph
gluconat
ATP ADP
ctose
Fructose
Fructose-6-P
PPS
ATP
ADP
ATP ADP
nose
Mannose
M-6-P
NADPH CO
Fructose-1,6-P
ATP ADP
cerin-
ehyd
Glycerin-
aldehyd
3-P-Glycerin-
aldehyd
Dihydroxy-
aceton-P
NAD+
NADH
1,3-P-Glycerat
ADP
ATP
3-P-Glycerat
2-P-Glycerat
Phosphoenolpyruvat
ADP
ATP
NADH NAD+
uvat
Pyruvat
Lactat
NADH
Krebszyklus
CO2

Rezeptor darstellt und vom metabolischen Abbau unabhängig ist, spricht, daß Galactose und andere nicht oder nur sehr langsam metabolisierbare Zucker die Insulinfreisetzung stimulieren ohne daß der Gehalt an Glucose-6-Phosphat ansteigt (7). Auch Fructose, Mannose und die Zuckeralkohole Xylitol und Sorbitol stimulieren die Sekretion, was nur durch einen Rezeptor relativ breiter Spezifität zu erklären ist (7). Auch gibt es experimentelle Befunde, daß Glucose die Freisetzung von Insulin unterhält, wenn mit Jodacetat die Glycolyse blockiert wird, wenn mit Pyruvat die Energieversorgung der Zelle gesichert ist (12). Umgekehrt kann mit 3-O-Methylglucose und Galactose, die nicht metabolisierbar sind, die Glycolyse (Parameter Lactatbildung) gesteigert werden, ohne daß eine Freisetzung von Insulin einhergeht (12). Phlorrhizin, ein Hemmstoff aktiven Transports der Glucose, stimuliert die Insulinsekretion auch ohne deren Anwesenheit. Da diese Stimulation mit Mannoheptulose hemmbar ist, wurde postuliert, daß diese Wirkung von einem Glucoserezeptor ausgehen könnte (13, 14). Auch übt Mannoheptulose einen sofortigen Hemmeffekt auf die Stimulierbarkeit der Glucose aus, während eine Hemmung der Glucoseoxidation erst 15 Minuten später eintritt (13). Es ist wahrscheinlich anzunehmen, daß es mehrere Mechanismen oder eine Kette von Reaktionen eines Mechanismus gibt, die die Freisetzung von Insulin regeln.

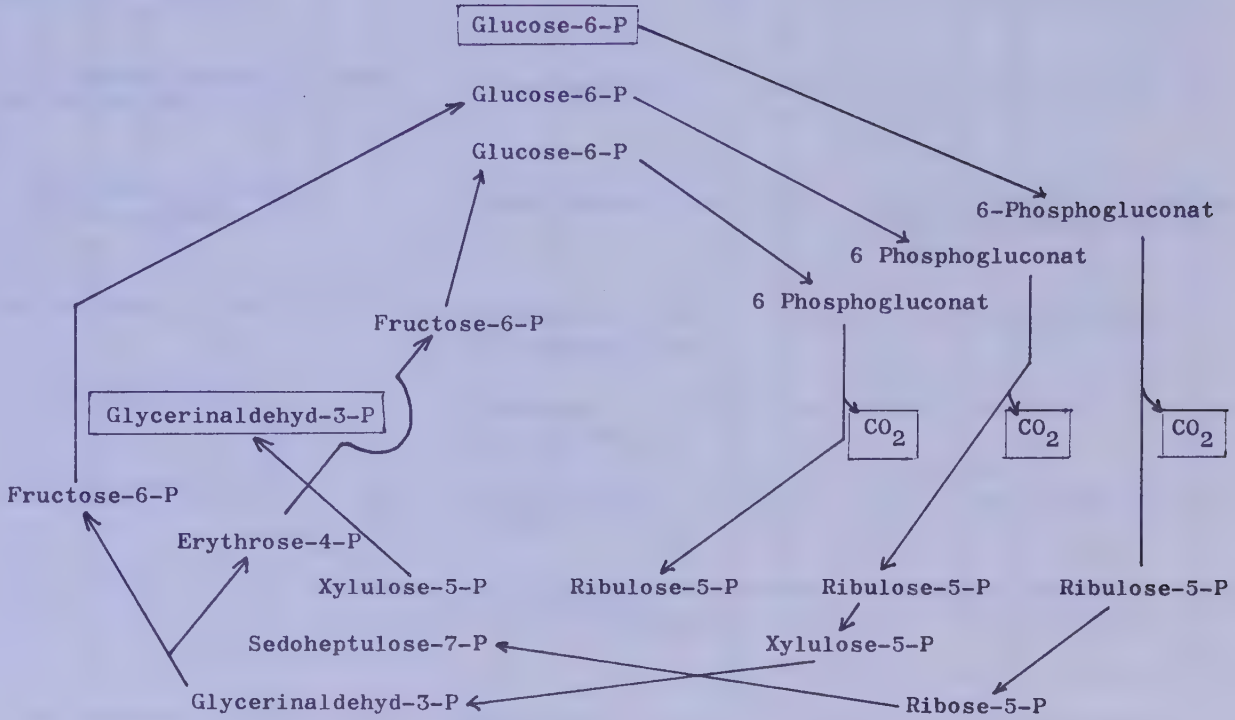
Ein interessantes Beispiel gaben Beckmann et al. (15). Sie stimulierten Langerhans'sche Inseln mit L-Glucose, von der man weiß, daß sie weder durch die Plasmamembran transportiert, noch metabolisiert werden kann (und demzufolge auch keine Energie in Form von ATP oder andere Cofaktoren zur Verfügung stellen kann). Erwartungsgemäß fehlte auch die Freisetzung von Insulin. Sie konnten aber zeigen, daß in Anwesenheit von substimulatorischen Mengen an D-Glucose sehr wohl durch Zugabe von L-Glucose eine Insulinsekretion zu erreichen ist. Die geringe Menge an D-Glucose mag ausreichen, Cofaktoren für die Sezernierung bereitzustellen und der nichtmetabolisierbaren Glucose zur Stimulierung zu verhelfen. Dies spricht dafür, daß neben der Wirkung der Glucose auf die Membran der Zelle auch deren Abbau von Bedeutung ist.
Daß die Glucose nicht ausschließlich ihre potente sekretorische Fähigkeit aus Metaboliten oder "Erregung" von Rezeptoren bezieht, mag daraus hervorgehen, daß viele Stoffe, physiologische wie die Aminosäuren Arginin und Leucin, oder Arzneistoffe wie das Tolbutamid, erst oder erst in vollem Umfange ihre Sekretionsleistungen bei gleichzeitiger Anwesenheit von Glucose entfalten. Der Mechanismus dieses permissiven Effekts der Glucose ist unbekannt. Andere Substanzen, die selbst fähig sind, Insulinsekretion auszulösen, wie z. B. Phlorrhizin, zeigen hinwiederum diese permissive Eigenschaft nicht. (16).

1. 2. Fragestellung

Montague und Taylor (17) fanden, daß Ribosen die Insulinfreisetzung stimulieren können. Als Metabolisierungsweg steht ihnen aber nur der Pentosephosphatzyklus (PPS) zur Verfügung (siehe Abbild. 2,3). Es wurde die Vermutung geäußert, daß diesem Abbauweg bei der Insulinsekretion Bedeutung zukommen könne. Heinze und Steinke (18) berichteten, daß bei Inseln fötaler Ratten, die auf einen Glucosestimulus nicht mit einer Sekretion von Insulin antworten, der Abbau der Glucose über die Glycolyse, nicht aber über den PPS abläuft. Erst im Alter von 1 - 2 Tagen tritt dieser Abbauweg in Erscheinung, gleichzeitig setzt auch die Stimulierbarkeit von Insulin ein. Diese Befunde, daß dem PPS Bedeutung bei der Insulinsekretion zukommt, wurden gestärkt, als Ammon und Steinke (19) zeigten, daß mit einer gezielten Hemmung des PPS auch eine Hemmung der Glucose induzierbaren Insulinsekretion einhergeht. Als Werkzeug benutzten sie 6-Amino-Nicotinamid, einen Antimetaboliten der Pyridinnukleotidsynthese. Den Zellen steht nach Vorbehandlung der Tiere in verstärktem Umfang statt NAD und NADPH dann jeweils das 6-Amino-Derivat zur Verfügung. Da in lebenden Zellen NAD immer im Überschuß vorliegt und somit der 6-Amino-Verbindung keine Wirkung zugeschrieben werden kann, lag der Schluß nahe, daß die Effekte auf 6-Amino-NADP zurückzuführen sind und so die NADP-abhängigen Reaktionen der Wasserstoffübertragung

Abbild. 2: Schema des Pentosephosphatzyklus

Ausgangsmaterialien und Endprodukte sind eingerahmt. Die sich kreuzenden Pfeile stellen Übertragungsreaktionen dar.



Abbild. 3:
Die Einzelreaktionen des Pentosephosphatzyklus und ihre quantitativen Beziehungen

(1)	3 Glucose-6-Phosphat + 3 NADP	Glucose-6-Phosphat-dehydrogenase →	3 6-Phosphogluconat + 3 $NADPH_2$
(2)	3 6-Phosphogluconat + 3 NADP	Phosphogluconat-dehydrogenase →	3 Ribulose-5-Phosphat + 3 CO_2 + 3 $NADPH_2$
(3)	Ribulose-5-Phosphat	Ribosephosphat-isomerase →	Ribose-5-Phosphat
(4)	2 Ribulose-5-Phosphat	Ribulosephosphat-3-epimerase →	2 Xylulose-5-Phosphat
(5)	Ribose-5-Phosphat + Xylulose-5-Phosphat	Transketolase →	Sedoheptulose-7-Phosphat + + Glycerinaldehyd-3-Phosphat
(6)	Sedoheptulose-7-Phosphat + Glycerinaldehyd-3-Phosphat	Transketolase →	Fructose-6-Phosphat + + Erythrose-4-Phosphat
(7)	Xylulose-5-Phosphat + Erythrose-4-Phosphat	Transketolase →	Fructose-6-Phosphat + + Glycerinaldehyd-3-Phosphat
(8)	2 Fructose-6-Phosphat	Glucosephosphat-isomerase →	2 Glucose-6-Phosphat
	Glucose-6-Phosphat + 6 NADP	→	3 CO_2 + Glycerinaldehyd-3-phosphat

beeinflußt werden, da 6-Amino-NADP den Wasserstoff nicht mehr übertragen kann. NADP ist Wasserstoffakzeptor im PPS an zwei Enzymen: bei der Überführung von Glucose-6-Phosphat zu 6-Phosphogluconat durch die Glucose-6-Phosphatdehydrogenase und bei der Dehydrogenase-Decarboxylase-Reaktion von 6-Phosphogluconat zu Ribulose-5-Phosphat durch die 6-Phosphogluconatdehydrogenase.

Daß durch die Hemmung dieser NADP-abhängigen Enzyme auch eine Hemmung der Glucoseoxidation über den PPS einhergeht, konnte am Vergleich der Oxidationsraten am C_1 und C_6 der Glucose gezeigt werden. Damit ging gleichzeitig eine Hemmung Glucose induzierter Insulinsekretion einher. Dies legte die Vermutung nahe, daß dem PPS bei der Insulinsekretion Bedeutung zukommt.

Von anderen Organen weiß man, daß die Aufgabe des PPS eben darin besteht, NADPH zu liefern und die entstehenden Ribosen für Nucleinsäuresynthesen zur Verfügung zu stellen. In welchem Zusammenhang aber der PPS für die Stimulierbarkeit der Insulinsekretion steht, ist bis heute ungeklärt. Eine Aufgabe besteht wohl darin, NADPH zu liefern. Die Bedeutung des NADPH ist unbekannt. Möglicherweise ist die Bereitstellung dieser reduzierten Pyridinnucleotide für die Aufrechterhaltung des Redoxstatus in der Zelle mitverantwortlich. Von Erythrocyten wissen wir, daß sich der Stoffwechsel der Kohlenhydrate auf die Glycolyse und die direkte Glucoseoxidation (oxidierender PPS) beschränkt. Dadurch wird NADPH bereitgestellt, das sowohl für die Reduktion von

Methämoglobin zu Hämoglobin als auch für die Integrität und Stabilität der Membran enorm wichtig ist. So liefert NADPH in vivo die notwendigen Reduktionsäquivalente für das Gleichgewicht zwischen oxidiertem und reduziertem Glutathion. Wird dieses Gleichgewicht zugunsten oxidierten Glutathions verschoben, sind Membranschäden (durch nicht mehr eliminierte Peroxide) und schwere Zelldefekte die Folge (20).

Auch die Augenlinse ähnelt in ihrem Gehalt an Glutathion den Erythrocyten. Auch hier ist ein ausreichender Spiegel an reduziertem Glutathion für die Funktionsfähigkeit von großer Bedeutung. Erniedrigung des GSH-Spiegels führt in vivo zu Kataraktbildung (21).

Bei den Nieren ist der Redoxstatus des Glutathions von großer Wichtigkeit, unter anderem für die Rückresorption von Aminosäuren aus dem Primärharn (22).

Auch wird eine wesentliche Rolle des Tripeptids bei der Freisetzung von Neurotransmittersubstanzen diskutiert (23, 24).

Ob und in welcher Weise dem reduzierten Glutathion im Mechanismus der Insulinsekretion Bedeutung zukommt, ist noch weitgehend unbekannt.

Bloom und Hellman (25) haben kürzlich berichtet, daß Thiol-Reagenzien, wie z. B. p-CMB, sehr rasch die Insulinsekretion stimulieren. Da sie aber nur sehr langsam in

die Zelle permeieren, lag die Vermutung nahe, daß der Effekt auf Reaktionen an membranständigen SH-Gruppen beruht. Daß diese wiederum mit GSH in der Zelle in Verbindung stehen, und GSH für den Thiol-Disulfid-Austausch gemäß folgenden Schemas

aus (26)

von Bedeutung ist, ist zumindest für Erythrocyten wahrscheinlich gemacht worden. Da aber in vivo das Enzym Glutathionreduktase, das GSH in der Reaktion oxidiertes Glutathion ⟶ reduziertes Glutathion katalysiert, als Cosubstrat NADPH benötigt, erscheint es möglich, daß hier ein enger Zusammenhang besteht.

Von Pagliara et al. (27) und Ammon et al. (28) konnte kürzlich gezeigt werden, daß das Vorhandensein freier SH-Gruppen in der Membran der ß-Zelle eine wichtige Voraussetzung für die Insulin freisetzende Wirkung der Glucose ist. Es erhebt sich nun die Frage, ob solche

membranständigen SH-Gruppen durch den Redoxzustand des intrazellulären GSH/GSSG-Quotienten moduliert werden können, der wiederum möglicherweise von NADPH abhängig gemacht werden kann. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob eine experimentelle Senkung des NADPH/NADP-Quotienten sowie des GSH/GSSG-Quotienten in der Langerhans'schen Insel die sekretorische Antwort gegenüber Glucose und anderer Stimuli, von denen man annehmen muß, daß sie das Signal zur Freisetzung von Insulin auf andere Weise geben als Glucose, beeinflussen können.

Der Beantwortung dieser Frage kann dadurch nähergekommen werden, indem man metabolische Hemmstoffe zur Senkung des NADPH-Spiegels einsetzt und die Stimulierfähigkeit der ß-Zelle auf bekannte Stimuli hin untersucht.

Eine gezielte Senkung des intrazellulären GSH-Gehaltes durch chemische Agentien bzw. durch gezielten biochemischen Eingriff in den Glutathionstoffwechsel und deren Erfolg auf die Insulinsekretion sollte über eine mögliche Bedeutung des reduzierten Glutathions im Mechanismus der Insulinsekretion Auskunft geben.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß sowohl eine Senkung des NADPH-Gehaltes der Zelle wie auch eine Senkung des Spiegels an reduziertem Glutathion zur verminderten Sekretionsleistung der Pankreasinsel nach allen verwendeten Stimuli führt.

2. METHODIK

Für die folgenden Untersuchungen wurde das Modell der isolierten Langerhans'schen Insel verwendet. Es lassen sich damit gezielte Untersuchungen anstellen, humorale Einflüsse des Organismus bleiben ausgeschaltet.

2. 1. Versuchstiere

Für die Pankreatektomien wurden Wistar-Ratten beiderlei Geschlechts mit einem Gewicht von 220 - 350 g verwendet. Den Tieren stand Standardfutter der Firma Altromin, Lage / Lippe und Trinkwasser ad libitum zur Verfügung. Die Haltung erfolgte in einem temperatur- und lichtthermostatierten Raum in unserem Institut.

2. 2. Material

2. 2. 1. Chemikalien

Collagenase (136 - 190 E/mg)	Worthington Biochem.Corp. Freehold, U.S.A.
L-Arginin	Serva, Heidelberg
A-D-Glucose	Serva, Heidelberg
Aminophyllin	Knoll, Heidelberg
Diamid	Synthetisiert von Dr. Vitzthum HAG AG, Bremen
INSIK - RIA-Kit Insulin	Isotopendienst West, Sprendlingen
L-Leucin	Serva, Heidelberg
Methylenblau	Behringwerke, Marburg
Rinderserumalbumin	Behringwerke, Marburg
Tolbutamid	Hoechst, Frankfurt
tert.-Butylhydroperoxid	Merck-Schuchard, München

Alle nicht genannten Chemikalien stammen von der Firma Merck, Darmstadt, und hatten den Reinheitsgrad "p.a.".

2. 2. 2. Nährlösungen

2. 2. 2. 1. Hank's Lösung

Stammlösung:	NaCl	80,0
	KCl	4,0

Na_2HPO_4 2 H_2O	0,75
KH_2PO_4	0,6
$MgSO_4$ 7 H_2O	2,0
$CaCl_2$ 2 H_2O	1,85
Aqua bidest. ad	1000,0 ml

Vor Gebrauch wird die Stammlösung 1 + 9 mit Aqua bidest. verdünnt und mit $NaHCO_3$-Lösung auf pH 7,35 eingestellt.

2. 2. 2. 2. Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung (KRB-Lösung)

Verwendet wurde die KRB-Lösung nach der Beschreibung von Umbreit et al. (29), die folgende Zusammensetzung aufweist:

NaCl-Lösung	0,90 % = 0,154 M	100 Teile
KCl-Lösung	1,15 % = 0,154 M	4 Teile
$CaCl_2$-Lösung	1,22 % = 0,11 M	3 Teile
KH_2PO_4-Lösung	2,11 % = 0,154 M	1 Teil
$MgSO_4$ 7 H_2O-Lösung	3,82 % = 0,154 M	1 Teil
$NaHCO_3$-Lösung	1,30 % = 0,154 M	21 Teile

Um diese Lösung über längere Zeit aufbewahren zu können, hat es sich als praktisch erwiesen, drei voneinander getrennte Lösungen folgender Zusammensetzung herzustellen:

Lösung A (Stammlösung ohne $NaHCO_3$ und $CaCl_2$)

NaCl	69,2 g
KCl	3,61 g
KH_2PO_4	1,62 g
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	2,93 g

gelöst in 1000 ml Aqua bidest.

Lösung B ($NaHCO_3$-Lösung)

$NaHCO_3$	21,1 g

gelöst in 1000 ml Aqua bidest.

Lösung C ($CaCl_2$-Lösung)

$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	3,73 g

gelöst in 1000 ml Aqua bidest.

Diese Lösungen wurden getrennt voneinander bei 4°C aufbewahrt und vor Gebrauch wie oben angegeben gemischt. Vor der Verwendung für Inkubationen wurde die Lösung mit Carbogen-Gas gesättigt.

2. 3. Experimenteller Teil

2. 3. 1. Operation

Die Ratten wurden mit Äther anästhesiert. Nach Eröffnen des Bauchraumes durch einen Schnitt vom Becken bis zum Brustbein und seitlichen Einschnitten wurde unter dem Leberlappen das Duodenum vorgezogen und der ductus hepaticus zur Leber hin abgebunden und das Duodenum

kurz nach der Einmündung des ductus in den Darm mit einer Klemme in Richtung Magen abgeklemmt. In den ductus pancreaticus wurde 10 ml eisgekühlte Hank's Lösung injiziert und somit das Pankreas aufgebläht. Mit einer Schere wurden die Verbindungen zu Leber, Milz, Magen und Darm gelöst und das Gewebe in einer gekühlten Petrischale, die etwas Hank's-Lösung enthielt, gewaschen und von anhaftendem Fett befreit.

2. 3. 2. Isolierung der Langerhans'schen Inseln nach Lacy und Kostianovsky (30)

Das Pankreas wurde mit einer Schere gleichmäßig zerkleinert und so fein zerschnitten, daß es sich mit einer 5 ml Rekordspritze ohne Widerstand am Konus aufziehen ließ. Das Volumen wurde auf 5 ml Hank's-Lösung ergänzt und in ein 20 ml Schnappdeckelglas überführt, das 30 mg Collagenase enthielt. In einem schnell schüttelndem Wasserbad (Frequenz: ca. 240 Bewegungen / Min.) bei 37° C ließ man das Enzym so lange einwirken, bis das Gewebe homogen zerkleinert und schleimig aussah. Je nach Aktivität der Collagenase und Zerkleinerungsgrad des Gewebes dauerte das 10 bis 16 Minuten. Das Inkubat wurde mit der Spritze aufgenommen und durch ein Plastiksieb in einen eisgekühlten Meßzylinder, in dem sich ca. 5 ml Hank's befand, überführt und auf 25 ml aufgefüllt. Durch dieses starke Verdünnen und den Temperatur-

wechsel auf 4° C wurde somit ein abruptes Beenden der Einwirkung des Enzyms auf das Gewebe erreicht. Da die Langerhans'schen Inseln spezifisch schwerer sind als das angedaute Gewebe des exokrinen Pankreas wurden sie in mehreren Sedimentationsschritten durch Absitzenlassen und Abnahme des Überstandes im Meßzylinder und Wiederaufschwemmen in Hank's-Lösung gewonnen. In einer Petrischale konnten dann die Inseln mit einer feinen, an der Spitze glatt geschmolzenen Pipette unter einem Mikroskop einzeln zwischen kleinverdautem exokrinen Pankreasgewebe aufgenommen und getrennt werden. Man erhält auf diese Weise etwa 100 bis 180 Inseln, die nun für Untersuchungen zur Verfügung stehen. Bei allen Arbeitsgängen außerhalb der Inkubationen wurde bei 4°C gearbeitet.

2. 3. 3. Herstellung von KRB-Lösung für die Inkubation der Inseln

Von den Stammlösungen wurden folgende Mengen genommen und gemischt:

Lösung A	10 ml
Lösung B	10 ml
Lösung C	10 ml
Aqua bidest. ad	100 ml

Anschließend wurde die Lösung mit Carbogen-Gas gesättigt.

2. 3. 4. Vorinkubation

Zur Regeneration des Stoffwechsels der Inseln wurden diese in einem 5 ml Gläschen gesammelt, das 2 ml begaste KRB-Lösung und 2 % Rinderserumalbumin enthielt. Die Glucosekonzentration betrug 0,3 mg/ml, das entspricht ca 1,7 mM Glucose. Das Gläschen wurde mit einem Gummistopfen verschlossen, mit einer Kanüle der Luftraum mit Carbogen begast (um den pH-Wert durch Entweichen von CO_2 nicht absinken zu lassen und eine Sauerstoffzufuhr zu gewährleisten) und 30 Minuten lang bei 37^{o} C im Wasserbad langsam geschüttelt (ca. 40 Bewegungen pro Minute). Nach Beendigung der Vorinkubation wurde dreimal mit eiskalter Hank's gewaschen, um die Inseln von möglicherweise anhaftendem Insulin zu befreien.

2. 3. 5. Hauptinkubation

Die Hauptinkubation diente der Messung der Insulinfreisetzung unter Zusatz von Stimulatoren und Hemmstoffen der Sekretion, wie dies später im Detail ausgeführt werden wird.
In Probegläschen von 2 ml Volumen wurden je 5 Inseln einsortiert, miteingeschleppte Flüssigkeit sorgsam unter dem Mikroskop abgesaugt und dabei die Inseln nochmals gezählt. Hierzu wurde je 1 ml Inkubationsmedium ein-

pipettiert, das entweder nur aus KRB-Lösung bestand (= Puffer) oder die Glucosekonzentrationen in mg/ml enthielt, wie dies bei den einzelnen Untersuchungen angegeben werden wird. Befanden sich weitere Substanzen im Medium, wurden sie entweder in den angegebenen Konzentrationen in mg/ml oder Molaritäten gelöst. Alle Inkubationslösungen enthielten 2 % Rinderserumalbumin und waren auf pH 7,35 eingestellt. Jede Serie wurde bei 37° C unter Begasung mit Carbogen und langsamem Schütteln (Frequenz ca. 40 Bewegungen / Minute) inkubiert. Um die Sekretionsleistung der Inseln nach der gewünschten Zeit von 90 Minuten zu stoppen, wurden alle Gläschen sofort nach der Inkubation in Eiswasser gestellt - hier stellt die ß-Zelle ihre Sekretion ein - und jeweils 0,1 ml für die quantitative Bestimmung des sezernierten Insulins abgenommen und im Gefrierschrank bei Temperaturen unter -25° C bis zur Insulinbestimmung aufbewahrt.

2. 3. 6. Radioimmunologische Bestimmung von Insulin

Die Insulinkonzentrationen im Hauptinkubationsmedium wurden durch Radioimmunoassay in Doppelbestimmungen nach der Doppel-Antikörper-Methode (31) mit dem INSIK-Kit durchgeführt. Da die Insulingehalte in 0,1 ml des

Mediums zu hoch für die Bestimmung sind, wurden sie mit je 0,9 ml folgenden Puffers verdünnt:

NaH_2PO_4	1,1 g
Rinderserumalbumin	2,0 g
Aqua bidest. ad	200,0 ml

Die Lösung wird mit 1 n NaOH auf pH 7,4 eingestellt.

Von den so erhaltenen Proben mit dem Volumen 1,0 ml wurden für die Bestimmung jeweils 0,1 ml eingesetzt. Um die sezernierten Insulinmengen der Proben messen zu können, wurde eine Eichkurve im Bereich 0 bis 200 µE IRI/ml mit Ratteninsulin erstellt. Die Durchführung erfolgte in Polystyrol-Teströhrchen. Als Nullpunkt der Eichkurve wurde 0,1 ml oben benannten Puffers vorgelegt.

Jeweils 0,1 ml der Eichkurvenlösungen und der zu bestimmenden Proben wurden mit je 0,1 ml Insulinbindungsreagens versetzt, gemischt und für 6 Stunden bei + 4° C inkubiert. Danach wurde auf die Proben jeweils 0,1 ml der Jod-125-markierten Insulinlösung pipettiert. Dieser Ansatz wurde für 18 Stunden bei + 4° C inkubiert. Nach dem Verdünnen jeder Probe mit 1 ml oben benannten Phosphatpuffer wurden alle Teströhrchen bei Raumtemperatur bei 3000 g für 15 Minuten zentrifugiert, um den Doppelantikörperkomplex am Röhrchenboden anzuhaften. Danach wurde der Überstand sorgfältig dekantiert, evtl. am

Gläschen haftende Tropfen abgesaugt, und die Röhrchen mit der Öffnung nach unten aufgestellt. Anschließend wurden die Nullwerte der Eichkurve, die nur markiertes Insulin enthielten, in einen automatischen γ-Zähler (Nuclear Chicago) gestellt, um die Zähldauer den gezählten counts anzupassen. Anschließend wurden alle Proben mit der ermittelten Zähldauer gemessen.

2. 3. 7. Versuchsauswertung

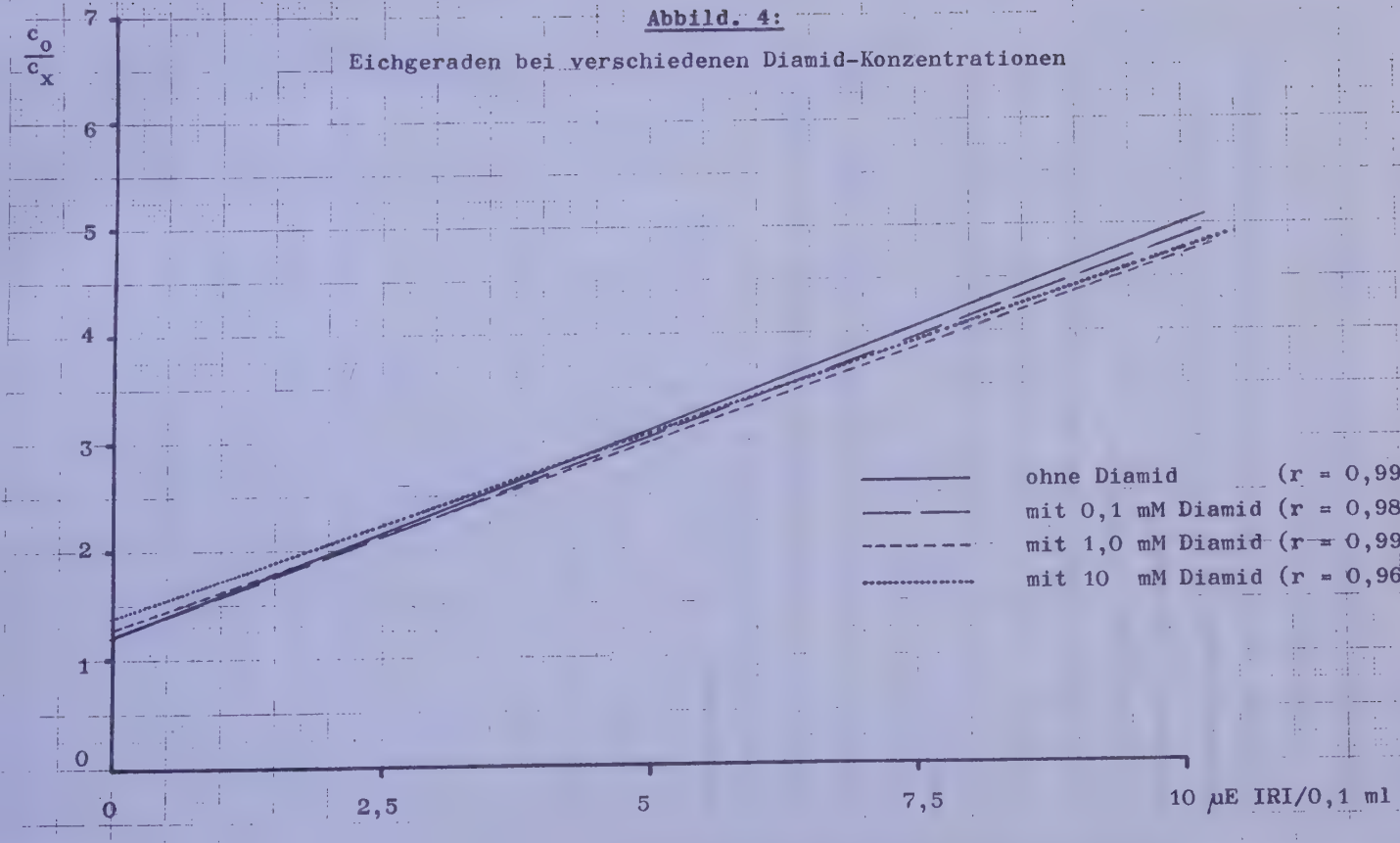
Für jede Probe wurde eine Durchschnittszählrate errechnet und als Prozentsatz der Durchschnittszählraten des Nullpunktes der Eichkurve ausgedrückt. Man zeichnet die Eichkurve, indem man auf der Ordinate eines Linearpapiers den Prozentsatz counts Eichprobe / counts des Nullpunktes und auf der Abszisse die Insulingehalte der Eichlösungen aufträgt. Man kann dann den Insulingehalt der Proben nach Errechnung des Quotienten ablesen, oder mit Hilfe eines Computerprogrammes errechnen lassen. Da sich die Werte auf 0,1 ml Probe beziehen, erhält man die Konzentrationen in µE/ml durch Multiplizieren mit 10. Die Angaben der Insulingehalte erfolgen in IRI (immunoreaktives Insulin) pro Milliliter. Alle in der Arbeit angegebenen Werte stellen Mittelwerte $\pm$ S.E.M. dar, errechnet aus der bei den Tafeln jeweils angegebenen Zahl von Versuchen (n). Für die Berechnung signifikanter Unterschiede wurde der t-Test nach Student verwendet.

2. 3. 8. Einfluß von Diamid und t-BHP auf den RIA

In dieser Arbeit wurden als Hemmstoffe der Insulinsekretion Diamid, Methylenblau und t-BHP verwendet. Während für MB bereits früher gezeigt werden konnte (32), daß es den Radioimmunoassay nicht stört, mußten solche Untersuchungen mit Diamid und t-BHP erst durchgeführt werden um sicher zu gehen, daß eine mögliche zu beobachtende Hemmung der Sekretion nicht auf eine Störung des Radioimmunoassays durch oben benannte Substanzen zurückzuführen ist.
Wie aus den Eichgeraden hervorgeht, zeigte weder Diamid noch t-BHP in den angegebenen Konzentrationen eine Beeinflussung des Assays.
Siehe Abbild. 4 und 5.

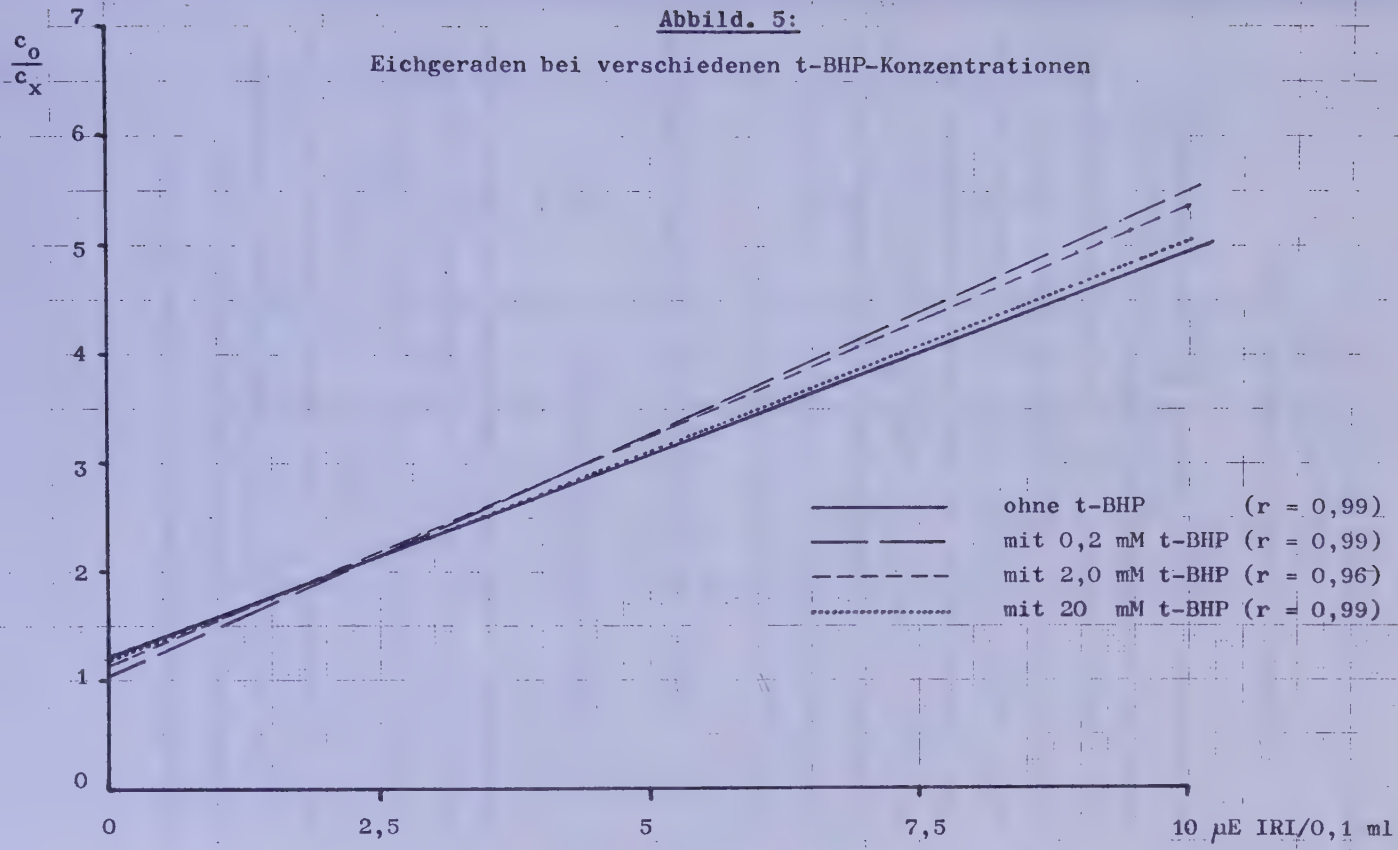
Abbild. 4:

Eichgeraden bei verschiedenen Diamid-Konzentrationen



Abbild. 5:

Eichgeraden bei verschiedenen t-BHP-Konzentrationen



3. V E R S U C H S E R G E B N I S S E

3.1. Glucose induzierte Insulinsekretion

Zur Überprüfung unseres Systems auf Funktionsfähigkeit wurden die Inseln mit Glucosekonzentrationen von 0, 1, 2 und 3 mg/ml inkubiert. Tab. 1 zeigt eine geringfügige, aber nicht signifikante Erhöhung der Insulinsekretion bei 1 mg/ml Glucose gegenüber dem Puffer. Konzentrationen von 2 und 3 mg/ml führten zu signifikanten Steigerungen der Insulinsekretion, wie sie auch von anderen Autoren gefunden wurden. Die größte Empfindlichkeit gegenüber dem Glucosestimulus zeigte sich zwischen 1 und 3 mg Glucose im Inkubationsmedium (siehe auch Abb. 6)

3. 2. Einfluß von Methylenblau auf die Insulinsekretion

3.2.1. Stimulation mit Tolbutamid

Während für Glucose bereits wahrscheinlich gemacht wurde, daß ihre Fähigkeit, die Insulinsekretion zu stimulieren, von NADPH abhängt (32), ist dies für andere Stimuli nicht untersucht worden. Da Methylenblau die Eigenschaft hat, NADPH zu oxidieren und damit dessen Konzentration in der ß-Zelle herabzusetzen (32), wurde der Frage nachgegangen, welchen Einfluß eine solchermaßen bewirkte Senkung des NADPH/NADP-Quotienten auf die durch Tolbutamid

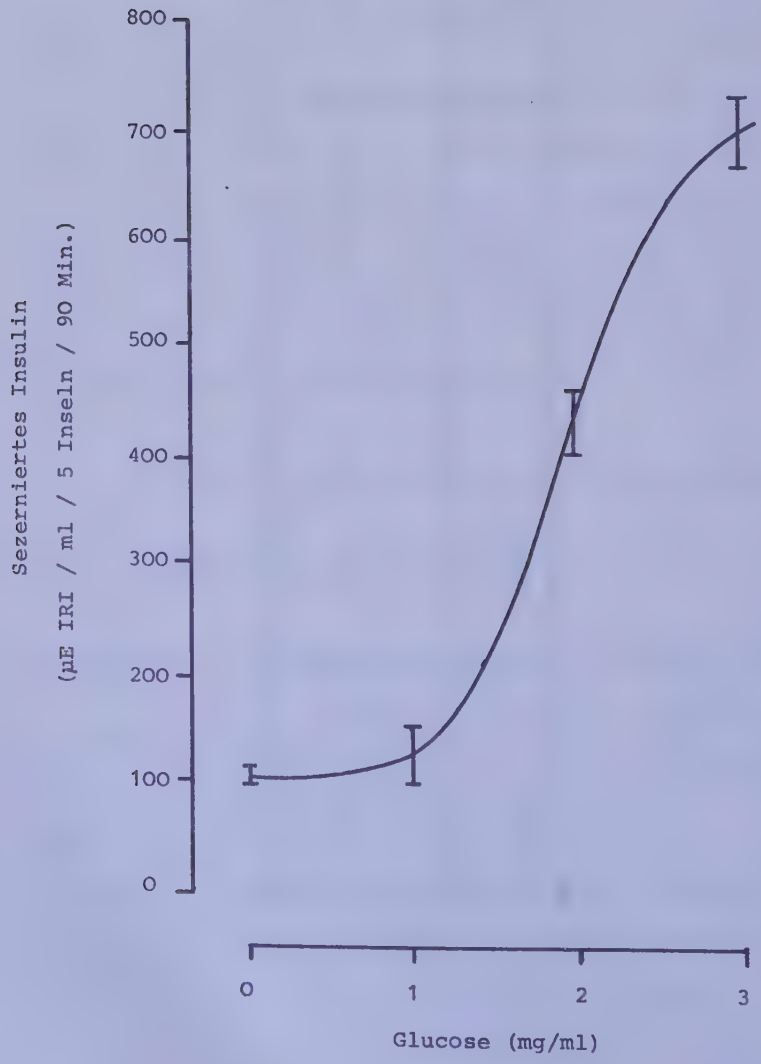
Tab. 1: Einfluß verschiedener Glucosekonzentrationen auf die Sekretion von Insulin aus isolierten Langerhans'schen Inseln der Ratte
Angabe in µE IRI / ml / 5 Inseln / 90 Min.
Mittelwerte ± SEM. n = Anzahl der Versuche

Puffer	Glucose (1 mg/ml)	Glucose (2 mg/ml)	Glucose (3 mg/ml)
A	B	C	D
106,2 ± 8,8	124,5 ± 27,2	430,8 ± 32,8	693,4 ± 32,8
(n = 41)	(n = 13)	(n = 40)	(n = 16)

Statistik: AB: n.s.
BC: $p < 0{,}001$
CD: $p < 0{,}001$

Abb. 6:

Einfluß der Glucosekonzentration auf die Freisetzung von Insulin bei isolierten Langerhans'schen Inseln der Ratte (siehe auch Tab. 1)



Mittelwerte ± SEM. n = 13 - 41

induzierbare Insulinsekretion hat.
Da Tolbutamid in Abwesenheit von Glucose oder bei substimulatorischen Glucosekonzentrationen keinen oder nur geringen Effekt zeigt (33, 34, 35), wurde für die folgenden Untersuchungen die noch nicht maximal stimulierende Glucosekonzentration von 2 mg/ml gewählt. Wie Tabelle 2 zeigt, wird die Insulinsekretion bei dieser Glucosemenge durch Tolbutamid von 430 auf 642 µE IRI erhöht. Die Zugabe von 2 µg/ml Methylenblau führte bei der durch Glucose induzierten Sekretion zu einer Abnahme um 160 µE auf 270 µE IRI, bei den mit Glucose + Tolbutamid stimulierten Inseln zu einer Abnahme um ca. 320 µE auf 321 µE IRI. Die gehemmte Sekretion lag dabei 110 µE unter der von Glucose alleine.

3. 2. 2. Stimulation mit Arginin

In Gegenwart von 2 mg/ml Glucose führten 10 mM Arginin wie aus Tabelle 3 hervorgeht, zu einer signifikanten Steigerung der Insulinsekretion von 590 µE auf 941 µE IRI. Methylenblau senkte die Sekretion von Glucose von 590 auf 336 µE IRI und der Kombination Glucose + Arginin von 941 auf 531 µE IRI. Insgesamt betrug die Abnahme durch Methylenblau bei mit Glucose stimulierten Inseln 254 µE und 410 µE bei Glucose + Arginin.

Tab. 2: Einfluß von Methylenblau auf die durch Tolbutamid und Glucose stimulierte Sekretion von Insulin aus isolierten Langerhans'schen Inseln der Ratte
Angabe in µE IRI / ml / 5 Inseln / 90 Min.
Mittelwerte ± SEM. n = Anzahl der Versuche

Methylen-blau	Puffer	Glucose (2 mg/ml)	Glucose (2 mg/ml) + Tolbutamid (0,1 mg/ml)
- -	A 106,2 ± 8,8 (n = 41)	C 430,8 ± 32,8 (n = 40)	E 642,8 ± 42,7 (n = 53)
2 µg/ml	B 99,9 ± 9,6 (n = 39)	D 270,6 ± 25,4 (n = 44)	F 321,0 ± 22,1 (n = 50)

Statistik: AB: n.s. CE: $p < 0{,}001$ CF: $p < 0{,}01$ EF: $p < 0{,}001$
AC: $p < 0{,}001$ CD: $p < 0{,}001$ DF: n.s.

Tab. 3: Einfluß von Methylenblau auf die durch Arginin und Glucose stimulierte Sekretion von Insulin aus isolierten Langerhans'schen Inseln der Ratte
Angabe in µE IRI / ml / 5 Inseln / 90 Min.
Mittelwerte ± SEM. n = Anzahl der Versuche

Methylen-blau	Puffer	Glucose (2 mg/ml)	Glucose (2 mg/ml) + Arginin (10 mM)
- -	A 72,8 ± 8,0 (n = 5)	C 590,8 ± 36,9 (n = 13)	E 941,6 ± 39,4 (n = 20)
2 µg/ml	B 99,9 ± 9,6 (n = 39)	D 336,5 ± 50,7 (n = 15)	F 531,3 ± 41,4 (n = 18)

Statistik: AB: n.s. CD: $p < 0{,}001$ CF: n.s. EF: $p < 0{,}001$
AC: $p < 0{,}001$ CE: $p < 0{,}001$ DF: $p < 0{,}001$

3. 2. 3. Stimulation mit Leucin

Der Zusatz von 10 mM Leucin führte bei Gegenwart von 2 mg/ml Glucose zu einer zusätzlichen, signifikanten Steigerung der Insulinsekretion um 447 µE IRI. Tabelle 4 zeigt, daß Methylenblau den kombinierten Effekt von Glucose + Leucin von 1037 auf 615 µE IRI zu senken vermochte, während die glucoseinduzierte Sekretion von 590 auf 336 µE IRI abnahm. Die gehemmte Stimulation von Glucose + Leucin lag nicht signifikant über der Sekretion von 2 mg/ml Glucose alleine.

3. 2. 4. Stimulation mit Aminophyllin

Von den Methylxanthinen wird angenommen, daß sie über eine Hemmung der Phosphodiesterase zur Stimulation der Insulinsekretion führen (36). Es sollte nun untersucht werden, ob auch die Stimulation der Insulinsekretion mit Aminophyllin durch Methylenblau beeinflußt werden kann. In Tabelle 5 ist gezeigt, daß Aminophyllin ohne Glucose zu einer signifikanten, wenn auch geringfügigen Steigerung der Insulinsekretion gegenüber dem Pufferwert führt. Ist Glucose mit anwesend, führten 10 mM Aminophyllin zu einer signifikanten Erhöhung der glucoseinduzierten Insulinsekretion von 590 auf 868 µE. Methylenblau vermochte die durch Aminophyllin induzierte

Tab. 4: Einfluß von Methylenblau auf die durch Leucin und Glucose stimulierte Sekretion von Insulin aus isolierten Langerhans'schen Inseln der Ratte
Angabe in µE IRI / ml / 5 Inseln / 90 Min.
Mittelwerte ± SEM. n = Anzahl der Versuche

Methylen-blau	Puffer	Glucose (2 mg/ml)	Glucose (2 mg/ml) + Leucin (10 mM)
- -	A 72,8 ± 8,0 (n = 5)	C 590,8 ± 36,9 (n= 13)	E 1037,1 ± 69,5 (n = 22)
2 µg/ml	B 99,9 ± 9,6 (n = 39)	D 336,5 ± 50,7 (n = 15)	F 615,3 ± 58,9 (n = 18)

Statistik: AB: n.s. CD: $p < 0{,}001$ CF: n.s. EF: $p < 0{,}001$
AC: $p < 0{,}001$ CE: $p < 0{,}001$ DF: $p < 0{,}001$

Tab. 5: Einfluß von Methylenblau auf die durch Aminophyllin und Glucose stimulierte Sekretion von Insulin aus isolierten Langerhans'schen Inseln der Ratte
Angabe in µE IRI / ml / 5 Inseln / 90 Min.
Mittelwerte ± SEM. n = Anzahl der Versuche

Methylen-blau	Puffer	Glucose (2 mg/ml)	Aminophyllin (10 mM)	Glucose (2 mg/ml) + Aminophyllin (10 mM)
- -	A 93,1 ± 10,5 (n = 20)	C 590,8 ± 36,9 (n = 13)	E 147,0 ± 11,8 (n = 16)	G 868,8 ± 68,9 (n = 19)
2 µg/ml	B 99,9 ± 9,6 (n = 39)	D 336,5 ± 50,7 (n = 15)	F 95,7 ± 20,7 (n = 11)	H 366,0 ± 61,7 (n = 17)

Statistik:

AB: n.s.	BF: n.s.	EG: $p < 0,001$
AC: $p < 0,001$	CD: $p < 0,001$	GH: $p < 0,001$
AE: $p < 0,005$	EF: $p < 0,05$	DH: n.s.

Steigerung um 502 µE auf 366 µE IRI zu erniedrigen; dies ist signifikant unter 590 µE, die Glucose allein sezernieren konnte.

3. 3. Einfluß von Diamid auf die Insulinsekretion

Die Untersuchungen mit Diamid sollten zeigen, ob durch Oxidation von GSH in der ß-Zelle die Sekretion von Insulin - ausgelöst durch verschiedene Stimulatoren - gehemmt wird.

3. 3. 1. Dosis-Wirkungs-Kurve mit Diamid

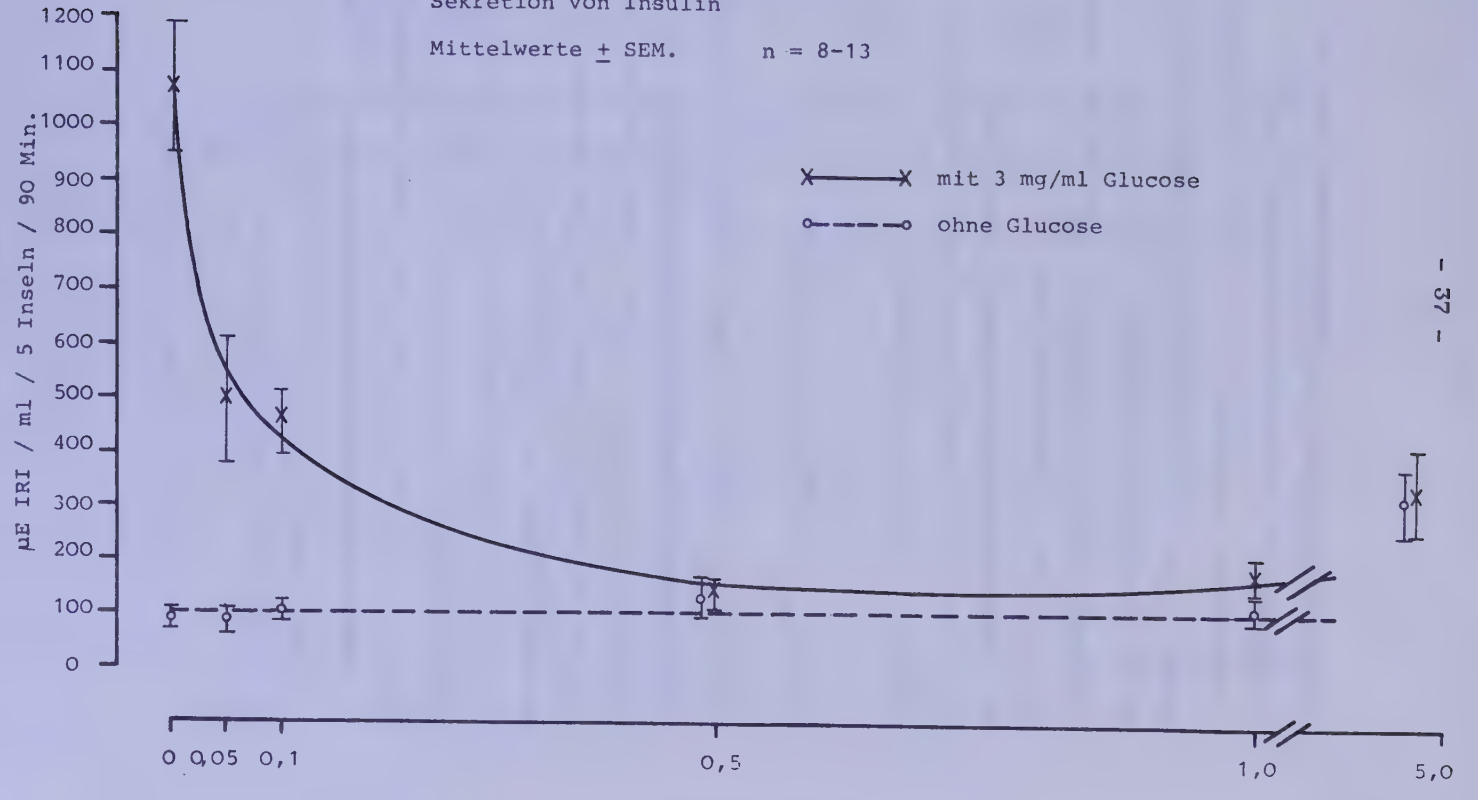
Um zu klären, ob mit steigenden Konzentrationen an Diamid im Inkubationsmedium eine zunehmende Hemmung der durch Glucose induzierten Insulinsekretion einhergeht, wurde eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt. Es zeigte sich, daß bis 0,5 m-molarer Konzentration an Diamid die ausgeschüttete Menge an Insulin abnimmt und diese bei 1 mM nahezu konstant bleibt. Bei gleichen Konzentrationen an Diamid, aber in Abwesenheit von Glucose, wurde die Mediumkonzentration an Insulin nicht beeinflußt. Bei 0,5 mM und 1,0 mM Diamid lagen die Sekretionen mit 3 mg/ml Glucose nicht mehr signifikant über denen ohne Glucose. Bei 5 mM Diamid stiegen die gefundenen Werte mit oder ohne Glucose auf über 300 µE IRI an. (Siehe auch Tab. 6 und Abb.7)

Tab. 6: Einfluß von verschiedenen Diamid-Konzentrationen auf die durch Glucose (3 mg/ml) ausgelöste Sekretion von Insulin aus isolierten Langerhans'schen Inseln der Ratte
Angabe in µE IRI / ml / 5 Inseln / 90 Min.
Mittelwerte ± SEM. Anzahl der Versuche: 8 - 13

Diamid	Puffer		Glucose (3 mg/ml)	
- -	A	88,7 ± 13,4	G	1068,0 ± 119,2
0,05 mM	B	85,9 ± 23,1	H	493,8 ± 113,0
0,1 mM	C	108,1 ± 19,8	I	452,9 ± 60,8
0,5 mM	D	134,6 ± 41,1	K	139,5 ± 26,5
1,0 mM	E	115,1 ± 22,1	L	173,2 ± 35,4
5,0 mM	F	320,6 ± 63,9	M	389,7 ± 80,3

Statistik: AB, AC, AD, AE: n.s. GH: $p < 0,001$
DK: n. s. HI: n.s.
EL: n. s. IK: $p < 0,001$
FM: n. s. KL: n.s.

Einfluß verschiedener Diamid-Konzentrationen
auf die durch 3 mg/ml ausgelöste
Sekretion von Insulin
Mittelwerte ± SEM. n = 8-13



Steigert man die Diamid-Konzentration auf 10 mM, so findet man stark erhöhte"Basalsekretionen"im Inkubationsmedium (siehe Tabelle 7). Weitere Untersuchungen an den so behandelten Pankreasinseln ergaben, daß diese während der Inkubation teilweise zerfallen und sich die Strukturen aufzulösen beginnen und somit passiv Insulin ausfließen kann. Dies erklärt auch die unverhältnismäßig große Standardabweichung (790,6 $\pm$ 564,2 S.D.). Für die folgenden Untersuchungen wurde daher die Konzentration 1 mM an Diamid gewählt.

3. 3. 2. Stimulation mit Glucose

Die Tabelle 7 zeigt die bekannte Zunahme der Insulinsekretion bei steigender Glucosekonzentration. Bei Stimulierung mit 3 mg/ml Glucose zeigte sich mit Diamid in einer Konzentration von 0,1 mM eine signifikante Abnahme der Sekretion von 693 auf 501 µE IRI.
1 mM Diamid erniedrigte die durch 2 und 3 mg/ml Glucose stimulierte Sekretion von 430 bzw. 693 µE IRI auf ca. 220 µE IRI, das entspricht einer Verringerung um 206 bzw. 474 µE IRI. Die Pufferwerte blieben unbeeinflußt. Steigert man die Menge an zugesetztem Diamid auf 10 mM, tritt Lyse der Zellen ein.

Tab. 7: Einfluß verschiedener Diamid-Konzentrationen auf die durch Glucose stimulierte Sekretion von Insulin aus isolierten Langerhans'schen Inseln der Ratte
Angabe in µE IRI / ml / 5 Inseln / 90 Min.
Mittelwerte ± SEM. n = Anzahl der Versuche

Diamid	Puffer	Glucose (2 mg/ml)	Glucose (3 mg/ml)
	A	E	G
- -	106,2 ± 8,8 (n = 41)	430,8 ± 32,8 (n = 40)	693,4 ± 32,8 (n = 16)
	B		H
0,1 mM	92,5 ± 16,4 (n = 12)		501 ± 64,2 (n = 16)
	C	F	I
1 mM	116,9 ± 23,9 (n = 22)	224,5 ± 20,3 (n = 14)	219,5 ± 29,1 (n = 19)
	D		K
10 mM	790,6 ± 106,6 (n = 28)		584,3 ± 104,5 (n = 15)

Statistik: AB: n.s. AE: $p < 0,001$ EF: $p < 0,001$ HI: $p < 0,001$
AC: n.s. DK: n.s. GH: $p < 0,01$

3. 3. 3. Stimulation mit Tolbutamid

In Gegenwart von 2 mg/ml Glucose führten 0,1 mg/ml Tolbutamid zu einer weiteren Erhöhung der bereits durch 2 mg/ml Glucose ausgelösten Insulinsekretion. Wurden die gleichen Versuche mit Zusatz von 1 mM Diamid durchgeführt (Tab. 8), erniedrigte sich die Stimulation mit Glucose von 430 auf 224 µE IRI, der Effekt von Glucose + Tolbutamid wurde von 642 auf 222 µE IRI gesenkt.

3. 3. 4. Stimulation mit Arginin

Wie Tabelle 9 zeigt, führten 10 mM Arginin bei Abwesenheit von Glucose nicht zur Sekretion von Insulin. In Gegenwart von 2 mg/ml Glucose vermochte Arginin dagegen die bereits durch Glucose ausgelöste Sekretion um weitere 350 µE auf 941 µE zu erhöhen. Setzte man dem Versuchsansatz 1 mM Diamid zu, verringerte sich die durch Glucose induzierte Sekretion um 366 von 590 auf 224 µE IRI, der kombinierte Effekt von Glucose + Arginin um 811 von 941 auf 130 µE IRI, was fast dem Pufferwert entspricht.

3. 3. 5. Stimulation mit Leucin

Tabelle 10 zeigt, daß 10 mM Leucin alleine zu keiner

Tab. 8: Einfluß von Diamid auf die durch Tolbutamid und Glucose stimulierte Sekretion von Insulin aus isolierten Langerhans'schen Inseln der Ratte
Angaben in µE IRI / ml / 5 Inseln / 90 Min.
Mittelwerte ± SEM. n = Anzahl der Versuche

Diamid	Puffer	Glucose (2 mg/ml)	Glucose (2 mg/ml) + Tolbutamid (0,1 mg/ml)
	A	C	E
- -	106,2 ± 8,8 (n = 41)	430,8 ± 32,8 (n = 40)	642,8 ± 42,7 (n = 53)
	B	D	F
1 mM	116,9 ± 23,9 (n = 22)	224,5 ± 20,3 (n = 14)	222,2 ± 22,3 (n = 17)

Statistik: AB: n.s. CD: $p < 0{,}001$ DF: n.s.
AC: $p < 0{,}001$ CE: $p < 0{,}001$ EF: $p < 0{,}001$

Tab. 9: Einfluß von Diamid auf die durch Arginin und Glucose stimulierte Sekretion von Insulin aus isolierten Langerhans'schen Inseln der Ratte
Angabe in µE IRI / ml / 5 Inseln / 90 Min.
Mittelwerte ± SEM. n = Anzahl der Versuche

Diamid	Puffer	Arginin (10 mM)	Glucose (2 mg/ml)	Glucose (2 mg/ml) + Arginin (10 mM)
- -	A 76,2 ± 8,0 (n = 5)	C 103,3 ± 9,6 (n = 4)	E 590,8 ± 36,9 (n = 13)	G 941,5 ± 39,3 (n = 20)
1 mM	B 116,9 ± 23,9 (n = 22)	D 163,3 ± 29,7 (n = 6)	F 224,5 ± 20,3 (n = 14)	H 130,2 ± 9,2 (n = 15)

Statistik: AB: n.s. EG: $p < 0{,}001$ GH: $p < 0{,}001$
AC: n.s. EF: $p < 0{,}001$ FH: $p < 0{,}001$

Tab. 10: Einfluß von Diamid auf die durch Leucin und Glucose stimulierte Sekretion von Insulin aus isolierten Langerhans'schen Inseln der Ratte
Angabe in µE IRI / ml / 5 Inseln / 90 Min.
Mittelwerte ± SEM. n = Anzahl der Versuche

Diamid	Puffer	Leucin (10 mM)	Glucose (2 mg/ml)	Glucose (2 mg/ml) + Leucin (10 mM)
- -	A 76,2 ± 8,0 (n= 5)	C 80,7 ± 17,2 (n = 4)	E 590,8 ± 36,9 (n = 13)	G 1037,1 ± 69,5 (n = 22)
1 mM	B 116,9 ± 23,9 (n = 22)	D 155,3 ± 25,7 (n = 8)	F 224,5 ± 20,3 (n = 14)	H 167,6 ± 17,2 (n = 13)

Statistik: AB: n.s. EG: $p < 0,001$ GH: $p < 0,001$
AC: n.s. EF: $p < 0,001$

Sekretion führt. Bei Gegenwart von 2 mg/ml Glucose kommt es mit Leucin zu einer signifikanten Erhöhung um 447 µE IRI gegenüber der durch Glucose alleine ausgelösten Sekretion von Insulin. 1 mM Diamid hemmte wieder die durch Glucose induzierte Sekretion um 366 µE IRI, den kombinierten Effekt von Glucose + Leucin aber um 869 µE IRI.

3. 3. 6. Stimulation mit Aminophyllin

Aminophyllin führte, wie in Tabelle 11 gezeigt ist, in einer Konzentration von 10 mM zu einer geringfügigen, aber statistisch signifikanten Erhöhung der Sekretion von 93 auf 147 µE IRI, bei Anwesenheit von 2 mg/ml Glucose steigt die Sekretion von 590 auf 868 µE IRI an. Der kombinierte Effekt von Glucose + Aminophyllin wurde durch 1 mM Diamid um 508 auf 360 µE IRI herabgesetzt, die durch Glucose induzierte Sekretion nur um 366 auf 224 µE IRI.

3. 4. Einfluß von t-BHP auf die Insulinsekretion

Da die Verwendung von Hemmstoffen das Risiko einschließt, daß auch andere Reaktionen als die gewünschte gehemmt werden (die Frage der Spezifität wird später diskutiert), ist es wünschenswert, Inhibitoren gleichen

Tab. 11: Einfluß von Diamid auf die durch Aminophyllin und Glucose stimulierte Sekretion von Insulin aus isolierten Langerhans'schen Inseln der Ratte
Angabe in µE IRI / ml / 5 Inseln / 90 Min.
Mittelwerte ± SEM. n = Anzahl der Versuche

Diamid	Puffer	Glucose (2 mg/ml)	Aminophyllin (10 mM)	Glucose (2 mg/ml) + Aminophyllin (10 mM)
- -	A 93,1 ± 10,5 (n = 20)	C 590,8 ± 36,9 (n = 13)	E 147,0 ± 11,8 (n = 16)	G 868,8 ± 68,9 (n = 19)
1 mM	B 116,9 ± 23,9 (n = 22)	D 224,5 ± 20,3 (n = 14)	F 95,7 ± 20,7 (n = 11)	H 360,7 ± 41,0 (n = 15)

Statistik:

AB: n.s.	BF: n.s.	CG: $p < 0,001$
AC: $p < 0,001$	CD: $p < 0,001$	GH: $p < 0,001$
AE: $p < 0,005$	EF: $p < 0,05$	DH: $p < 0,01$

Effekts aber mit verschiedenen Mechanismen zu verwenden. Außer dem bereits beschriebenen Hemmstoff Diamid wurde daher eine weitere Substanz eingesetzt, die zu einer Herabsetzung des Gehaltes an reduziertem Glutathion in der Zelle führt (37), und danach die Sekretion von Insulin gemessen.

3. 4. 1. Stimulation mit Glucose

Die Tabelle 12 zeigt die bekannte Zunahme der Insulinsekretion mit 3 mg/ml Glucose. Setzte man dem Inkubationsmedium t-BHP zu, so zeigt sich bei einer Konzentration von 2 mM eine hochsignifikante Hemmung von 761 auf 176 µE IRI. Steigert man die Menge an zugesetztem t-BHP auf 4, 6 und 10 mM, so zeigt sich, daß der maximale Hemmeffekt erreicht ist. Die noch sezernierten Mengen an Insulin liegen annähernd gleich hoch und nicht signifikant über der Pufferkontrolle. Für die folgenden Versuche wurde deshalb die Konzentration 2 mM an t-BHP gewählt. Auch bei Stimulation mit 2 mg/ml Glucose zeigten 2 mM t-BHP eine signifikante Hemmung der Insulinsekretion von 465 auf 117 µE IRI, die nicht mehr signifikant über dem Basalwert ohne Glucose liegt (Tab. 13). Die Sekretion war somit vollständig gehemmt.

Tab. 12: Einfluß von verschiedenen Konzentrationen an t-BHP auf die durch Glucose stimulierte Sekretion von Insulin aus isolierten Langerhans'schen Inseln der Ratte
Angabe in µE IRI / ml / 5 Inseln / 90 Min.
Mittelwerte ± SEM. n = Anzahl der Versuche

t-BHP	Puffer		Glucose (3 mg/ml)	
- -	A	101,0 ± 20,9 (n = 3)	C	761,9 ± 53,5 (n = 21)
2 mM	B	68,6 ± 10,1 (n = 10)	D	176,6 ± 32,4 (n = 5)
4 mM			E	177,6 ± 47,1 (n = 7)
6 mM			F	187,8 ± 35,3 (n = 6)
10 mM			G	178,8 ± 30,8 (n = 6)

Statistik: AB: n.s. DE, EF, FG: n.s.
CD: $p < 0{,}001$

Tab. 13: Einfluß von t-BHP auf die durch Glucose stimulierte Sekretion von Insulin aus isolierten Langerhans'schen Inseln der Ratte
Angabe in µE IRI / ml / 5 Inseln / 90 Min.
Mittelwerte ± SEM. n = Anzahl der Versuche

t-BHP	Puffer	Glucose (2 mg/ml)	Glucose (3 mg/ml)
- -	A 101,0 ± 20,9 (n = 3)	C 465,8 ± 40,8 (n = 28)	E 761,9 ± 53,5 (n = 21)
2 mM	B 68,6 ± 10,1 (n = 10)	D 117,0 ± 20,1 (n = 20)	F 176,6 ± 32,4 (n = 5)

Statistik: AB: n.s. DF: n.s.
CD: $p < 0,001$ EF: $p < 0,001$

3. 4. 2. Stimulation mit Tolbutamid

Die durch Tolbutamid von 465 auf 820 µE IRI erhöhte Sekretion durch 2 mg/ml Glucose konnte, wie Tabelle 14 zeigt, durch 2 mM t-BHP um 669 auf 151 µE gesenkt werden, während die Stimulation mit Glucose alleine um 348 auf 117 µE IRI abnahm. Die in beiden Fällen noch sezernierten Mengen an Insulin sind nicht signifikant voneinander verschieden.

3. 4. 3. Stimulation mit Arginin

Daß 10 mM Arginin die durch Glucose veranlaßte Insulinsekretion weiter erhöht, wurde schon gezeigt. Der Zusatz von 2 mM t-BHP führte, wie Tabelle 15 zeigt, bei 2 mg/ml Glucose zu einer Verminderung der Sekretion von 465 auf 117 µE IRI, der kombinierte Effekt von Glucose + Arginin wurde um 458 µE auf 325 µE IRI verringert.

3. 4. 4. Stimulation mit Leucin

Wie Tabelle 16 zeigt, war die um 446 µE durch Leucin gesteigerte Insulinsekretion von 2 mg/ml Glucose durch 2 mM t-BHP signifikant zu hemmen. Die Abnahme betrug 893 µE IRI. Die noch sezernierte Menge an Insulin lag nicht wesentlich über der mit t-BHP gehemmten Sekretion durch Glucose.

Tab. 14: Einfluß von t-BHP auf die durch Tolbutamid und Glucose stimulierte Sekretion von Insulin aus isolierten Langerhans'schen Inseln der Ratte
Angabe in µE IRI / ml / 5 Inseln / 90 Min.
Mittelwerte ± SEM. n = Anzahl der Versuche

t-BHP	Puffer	Glucose (2 mg/ml)	Glucose (2 mg/ml) + Tolbutamid (0,1 mg/ml)
- -	A 91,6 ± 20,7 (n = 18)	C 465,8 ± 40,8 (n = 28)	E 820,6 ± 58,5 (n = 19)
2 mM	B 68,6 ± 10,1 (n = 10)	D 117,0 ± 20,1 (n = 20)	F 151,5 ± 22,3 (n = 26)

Statistik: AB: n.s. CD: $p < 0,001$ DF: n.s.
AC: $p < 0,001$ CE: $p < 0,001$ EF: $p < 0,001$

Tab. 15: Einfluß von t-BHP auf die durch Arginin und Glucose stimulierte Sekretion von Insulin aus isolierten Langerhans'schen Inseln der Ratte
Angabe in µE IRI / ml / 5 Inseln / 90 Min.
Mittelwerte ± SEM. n = Anzahl der Versuche

t-BHP	Puffer	Arginin (10 mM)	Glucose (2 mg/ml)	Glucose (2 mg/ml) + Arginin (10 mM)
- -	A 91,6 ± 20,7 (n = 18)	C 103,5 ± 9,6 (n = 4)	E 465,8 ± 40,8 (n = 28)	G 783,7 ± 94,7 (n = 11)
2 mM	B 68,6 ± 10,1 (n = 10)	D 101,0 ± 15,0 (n = 6)	F 117,0 ± 20,1 (n = 20)	H 325,6 ± 43,3 (n = 12)

Statistik: AB: n.s. CD: n.s. EG: $p < 0,001$ GH: $p < 0,001$
AC: n.s. EF: $p < 0,001$ FH: $p < 0,001$

Tab. 16: Einfluß von t-BHP auf die durch Leucin und Glucose stimulierte Sekretion von Insulin aus isolierten Langerhans'schen Inseln der Ratte
Angabe in µE IRI / ml / 5 Inseln / 90 Min.
Mittelwerte ± SEM. n = Anzahl der Versuche

t-BHP	Puffer	Leucin (10 mM)	Glucose (2 mg/ml)	Glucose (2 mg/ml) + Leucin (10 mM)
- -	A 76,2 ± 8,0 (n = 5)	C 80,7 ± 17,2 (n = 4)	E 590,8 ± 36,9 (n = 13)	G 1037,1 ± 69,5 (n = 22)
2 mM	B 68,6 ± 10,1 (n = 10)	D 109,1 ± 17,3 (n = 6)	F 117,0 ± 20,1 (n = 20)	H 143,4 ± 13,0 (n = 15)

Statistik: AB: n.s. AC: n.s. CD: n.s. EF: $p < 0,001$ EG: $p < 0,001$ GH: $p < 0,001$ FH: n.s.

3. 4. 5. Stimulation mit Aminophyllin

Auch die durch Aminophyllin um weitere 278 µE gesteigerte Sekretion durch 2 mg/ml Glucose konnte durch t-BHP, wie in Tabelle 17 gezeigt wird, signifikant gehemmt werden. Die Abnahme betrug hierbei 748 µE, bei Glucose alleine 473 µE IRI. In Gegenwart von t-BHP unterschieden sich sowohl die durch Glucose als auch die durch Glucose + Aminophyllin freigesetzten Mengen an Insulin nicht mehr signifikant von den Kontrollversuchen ohne jeglichen Zusatz (Puffer).
t-BHP führte bei Aminophyllin ohne Glucose zu einer signifikanten Abnahme der Insulinsekretion.

Tab. 17: Einfluß von t-BHP auf die durch Aminophyllin und Glucose stimulierte Sekretion von Insulin aus isolierten Langerhans'schen Inseln der Ratte
Angabe in µE IRI / ml / 5 Inseln / 90 Min.
Mittelwerte ± SEM. n = Anzahl der Versuche

t-BHP	Puffer	Glucose (2 mg/ml)	Aminophyllin (10 mM)	Glucose (2 mg/ml) + Aminophyllin (10 mM)
- -	A 93,1 ± 10,5 (n = 20)	C 590,8 ± 36,9 (n = 13)	E 147,0 ± 11,8 (n = 16)	G 868,8 ± 68,9 (n = 19)
2 mM	B 68,6 ± 10,1 (n = 10)	D 117,0 ± 20,1 (n = 26)	F 78,0 ± 9,1 (n = 17)	H 120,3 ± 37,5 (n = 26)

Statistik: AB: n.s. EF: $p < 0,001$ GH: $p < 0,001$
CG: $p < 0,001$ CD: $p < 0,001$

4. DISKUSSION

Neben der Glucose stimulieren eine Reihe anderer Stoffe wie Tolbutamid, Arginin, Leucin und Aminophyllin die Sekretion von Insulin. Dabei kann man davon ausgehen, daß zunächst das den Sekretionsvorgang auslösende Signal gegeben wird und anschließend dieses Signal von der ß-Zelle so weiterverarbeitet wird, daß schließlich präformiertes Insulin, das im wesentlichen in den Granula vorliegt, durch einen Prozeß der Emiocytose zur Freisetzung außerhalb der ß-Zelle gebracht wird. Es handelt sich hierbei um eine Kette von Ereignissen, an der eine Reihe unterschiedlicher biochemischer Vorgänge beteiligt sind. Eingriffe in diese Vorgänge an irgend einer Stelle dürften schließlich zu einer Beeinflussung der Sekretionsleistung führen, sei es im Sinne einer Steigerung oder einer Hemmung. In diesem Zusammenhang ist es verständlich, daß bisher zum Sekretionsmechanismus verschiedener Stimulatoren und Hemmstoffe der Insulinsekretion eine Reihe von Untersuchungen durchgeführt wurden mit der Frage, wo in der Sequenz der Ereignisse, die zur Sekretion führen, Angriffspunkte dieser Stoffe zu suchen sind.

4. 1. Darstellung der Literatur zur Insulin freisetzenden Wirkung von Tolbutamid, Arginin, Leucin und Aminophyllin

4. 1. 1. Tolbutamid

Der Sulfonylharnstoff Tolbutamid wird seit langer Zeit bei der Behandlung nicht insulinbedürftiger Diabetiker angewendet. Der Mechanismus, über den Tolbutamid Insulin freizusetzen vermag, ist jedoch noch ungeklärt. Die sekretionssteigernde Wirkung ist dabei an die gleichzeitige Anwesenheit von Glucose geknüpft: ohne sie ist Tolbutamid weitgehend unwirksam, es steigert aber die sekretorische Wirkung stimulatorischer Glucosekonzentrationen (38). Inwieweit ein Zusammenhang zwischen dem Glucosestoffwechsel und der Wirkung des Tolbutamid besteht, ist noch unklar. So kann Tolbutamid - im Gegensatz zu Glucose - die Insulinsekretion stimulieren, auch wenn die Glucoseoxidation durch Mannoheptulose blockiert wird (39). Auch der Glucosestoffwechsel über den PPS scheint für die insulinfreisetzende Wirkung - wieder im Gegensatz zu Glucose - nicht unbedingte Voraussetzung zu sein, denn die sekretionssteigernde Wirkung bleibt bestehen, wenn der PPS der Pankreasinsel durch 6-AN gehemmt ist (40). Tolbutamid selbst hat zwar keinen Einfluß auf die Glucoseutilisation (41) und auf den PPS (40), doch sprechen Befunde mit anderen Untersuchungstechniken dafür, daß Tolbutamid die Glycogenolyse, den PPS und die Glycolyse stimuliert. Dies ergibt sich aus Untersuchungen, nach denen in der ß-Zelle unter dem Einfluß von Sulfonylharnstoffen der Glycogen-

gehalt abnimmt (42), G-6-P, 6-PG (43) und die Lactatbildung (44) dagegen zunehmen. Die Steigerung des Glucosestoffwechsels wird in Zusammenhang mit einer Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung, die zu einer Senkung des ATP-Spiegels unter vermehrter Bildung von ADP, AMP und P_i führt, diskutiert (45). Eine solche Modifikation im Phosphatgehalt steigert in anderen Zellen den glycolytischen Abbau (45). Diese Vermutung wird unterstützt durch den Befund, daß Sulfonylharnstoffe den Inselgehalt an ATP senken (46) und die Aufnahme von Sauerstoff steigern (47). Es erscheint allerdings mehr wahrscheinlich, daß die Beeinflussung des ATP durch Tolbutamid eher die Konsequenz als die Ursache der Stimulation darstellt. Im Bereich der Pyridinnucleotide wurden an der Insel bisher keine deutlichen Veränderungen beobachtet (40). Nimmt man die Ergebnisse der Untersuchungen zur Glucoseoxidation und die der Bestimmung von Metaboliten der ß-Zelle zusammen, so ergibt sich eher ein widersprüchliches Bild, das keine abschließende Beurteilung der Rolle des Kohlenhydratstoffwechsels bei der Tolbutamidwirkung zuläßt. Dies mag nicht zuletzt daran liegen, daß die gewählten experimentellen Bedingungen nicht optimal waren. Es wurde nämlich gezeigt, daß bei in vitro Experimenten durch Stimulation in das Medium freigesetzte Insulin auf den Stoffwechsel der ß-Zelle zurückwirkt, z.B. indem es den PPS hemmt und zu einer Senkung des NADPH/NADP-Quotienten führt (48).

Diese Phänomene waren bei der Durchführung der diskutierten Versuche nicht bekannt.
Als weiterer Angriffspunkt wird das c-AMP-System diskutiert. So wurde an Inseln durch Tolbutamid eine Hemmung der Phosphodiesterase (49) und ein Anstieg an c-AMP gefunden (50). Auch eine Aktivierung der Adenylcyclase ist beschrieben (51). So steigert Tolbutamid die sekretorische Wirkung von Aminophyllin, c-AMP-dibutyrat und Glucagon (40).
Kürzlich wurde von Hellman et al. (52) postuliert, daß, obwohl chemisch nicht sehr einleuchtend, Sulfonylharnstoffe mit SH-Gruppen auf der Membran der ß-Zelle reagieren und auf diese Weise die Sekretion von Insulin auslösen können. Dies ist besonders für das Tolbutamid von Interesse, da dieses die ß-Zellmembran nicht permeieren kann (53). Es ist daher denkbar, daß seine Wirkung auf die Insulinsekretion in irgendeiner Weise vom Redoxzustand membranständiger SH-Gruppen abhängig ist. Letztere dürften in Verbindung mit dem Redoxzustand des SH-SS-Systems (z.B. GSH - GSSG) im Zellinnern und damit auch mit dem Redoxzustand der Pyridinnucleotide (insbesondere NADPH/NADP) stehen (28). Da aber, wie schon erwähnt, die Wirkung auf die Insulinsekretion nur in Gegenwart von stimulatorischen Glucosemengen ausgeprägt ist, ergibt sich die Möglichkeit, daß Tolbutamid entweder mit der Signalwirkung der Glucose selbst im Sinne einer Sensibilisierung in Zusammenhang

steht, oder aber auf den Glucosemetabolismus angewiesen ist, der bei hohen Glucosekonzentrationen in der ß-Zelle verstärkt abläuft. Demzufolge erscheint es denkbar, daß bei Anwesenheit größerer Glucosekonzentrationen mehr Metaboliten oder Cofaktoren gebildet werden, von denen einer oder mehrere für den Insulin freisetzenden Effekt des Tolbutamid erforderlich sind.

4. 1. 2. Arginin und Leucin

Von den beiden Aminosäuren Arginin und Leucin ist seit langem bekannt, daß sie die Insulinsekretion stimulieren. Es liegen aber unterschiedliche Ergebnisse vor, ob dazu Glucose benötigt wird (54, 55) oder nicht (56, 57). Dabei scheint Arginin glucoseabhängiger zu sein als Leucin. Arginin selbst wird in der ß-Zelle nicht verstoffwechselt und führt zu keiner Steigerung der Glucoseoxidation (58). Auch der Gehalt an reduzierten Pyridinnucleotiden, gemessen an der Gesamtfluoreszenz, wurde durch Arginin nicht verändert (59). Wurde NADPH und NADH separat bestimmt, so zeigt sich, daß der Gehalt an NADPH in den Inseln geringfügig, aber nicht signifikant erhöht wird. NADP, NAD und NADH blieben unbeeinflußt (60).
Da die Wirkung des Arginin von der Glucosekonzentration abhängt, erscheint es aber auch möglich, daß der Glucosemetabolismus Metaboliten oder Cofaktoren für die Sekretionsfähigkeit des

Arginin bereitstellt. So hemmt Mannoheptulose die Insulin freisetzende Wirkung des Arginin (61).
Milner (62) berichtete, daß Arginin die Insulinsekretion indirekt durch Glucagonfreisetzung aus den α-Zellen stimulieren könne und auf diesem Wege zu einer Erhöhung des Inselgehaltes an c-AMP führt. Dies wird unterstützt durch den Befund, daß Aminophyllin die Insulin freisetzende Wirkung des Arginin potenziert (63).
Im Gegensatz zu Arginin scheint Leucin glucoseunabhängiger zu sein. So stimuliert Leucin, im Gegensatz zu Arginin, die Sekretion von Insulin bereits ohne oder in Anwesenheit geringer Konzentrationen an Glucose (57), und Mannoheptulose ist nicht in der Lage, die sekretionssteigernde Wirkung von Leucin in Gegenwart stimulatorischer Glucosemengen zu hemmen (64). Zwar fanden Hellman et al. (65), daß Leucin die Glucoseoxidation geringfügig steigert, diese Befunde konnten allerdings in unserem Labor nicht bestätigt werden. Von Panten et al. (66) wurde eine Zunahme der Fluoreszenz reduzierter Pyridinnucleotide gefunden. Unterscheidet man zwischen NADH und NADPH, so zeigt sich, daß neben einem Anstieg von NADH auch NADPH signifikant zunimmt. Auch der NADPH/NADP-Quotient wird dabei erhöht (60). Da Leucin einerseits den PPS nicht beeinflußt, andererseits sehr rasch von der ß-Zelle metabolisiert werden kann (58) und auf diesem Wege NADH liefert, wäre es möglich, daß Reduktionsäquivalente

durch Transhydrogenase-Reaktionen auf NADP übertragen werden und somit ein Ansteigen des NADPH bewirken, das möglicherweise eine Rolle im Mechanismus der durch Leucin stimulierten Sekretion von Insulin spielt.

4. 1. 3. Aminophyllin

Dem c-AMP, das bisher in allen Organismen gefunden wurde, kommen wichtige regulatorische Aufgaben für die Funktion und den Stoffwechsel der Zelle zu. Auch für die Insulinfreisetzung aus der Pankreasinsel scheint das c-AMP-Phosphodiesterase-System Bedeutung zu haben. So steigern Coffein oder Theophyllin die Insulinsekretion bei isolierten Inseln der Ratte (36). Die stimulierende Wirkung der Methylxanthine wird ihrer Hemmwirkung auf die Phosphodiesterase zugeschrieben. So fand sich nach in vitro Zugabe von 10 mM Theophyllin bei isolierten Inseln von obob-Mäusen eine 93 %ige Hemmung, bei Inseln der normalen Maus eine 50 %ige Hemmung der Phosphodiesterase (67, 68). Der Inaktivierung entsprechend, fanden Montague und Cook (69) an isolierten Inseln der Ratte einen Anstieg des c-AMP durch Theophyllin, der durch Glucagon noch verstärkt wurde. Auch Glucose selbst führt zu einem Anstieg an c-AMP in der Pankreasinsel (70). Während die Wirkung der Methylxanthine bei Abwesenheit von Glucose nicht oder nur in geringem Umfang nachweisbar ist, nimmt sie

bei steigender Glucosekonzentration zu, auch wenn diese ihrerseits die Sekretion von Insulin noch nicht beeinflußt.

Dem Glucosemetabolismus scheint dabei Bedeutung zuzukommen. So wurde an isolierten Inseln die durch Coffein und Glucose stimulierte Insulinsekretion durch Hemmstoffe der Glucosephosphorylierung, wie Mannoheptulose oder Glucosamin, sowie durch Hemmung der G-6-P-Isomerase durch 2-Desoxyglucose stark vermindert (46). Eine Hemmung der durch Aminophyllin in Anwesenheit von Glucose induzierten Abgabe von Insulin aus isolierten Inseln der Ratte wurde auch bei Blockade des Abbaus von Glucose im PPS durch 6-AN beobachtet (35). Es ist wiederum möglich, daß die Aufgabe der Glucose oder ihrer Metaboliten im Intermediärstoffwechsel darin besteht, notwendige Cofaktoren, wie z.B. ATP oder NADPH auch für die Insulin freisetzende Wirkung der Methylxanthine zur Verfügung zu stellen, insbesondere weil die sekretorische Wirkung der Methylxanthine von der Glucosekonzentration abhängig ist. (Vergl. S. 32)

In welcher Weise nun c-AMP in den Sekretionsmechanismus eingreift, ist unbekannt. Eine Möglichkeit besteht darin, auf intrazelluläres Calcium zu wirken. Die Konzentration an freiem Ca in der Zelle wird bestimmt durch die Freisetzung und Wiederaufnahme der Calcium-Ionen in Speichergranula und durch Aufnahme oder Abgabe in

oder aus der Zelle. Bei isolierten Inseln kommt es unter Theophyllin-Wirkung zu einer vermehrten intrazellulären Freisetzung von Calcium, während eine vermehrte Aufnahme aus dem Medium in die Zelle nicht beobachtet wird (71). Die Wirkung des Calciums auf die Insulinsekretion soll unter anderem darin bestehen, daß dadurch eine Kontraktion des mikrotubulären, mikrofilamentären Systems ausgelöst wird, das Insulin enthaltende Granula zur Emiocytose verhilft (72). Der Sekretionsvorgang benötigt aber dazu Cofaktoren, wie Kalium und Natrium und den Abbau der Glucose (9).

4. 2. Einfluß von Methylenblau auf die Sekretion von Insulin

Daß der PPS bzw. das NADPH/NADP-System eine Bedeutung für die G l u c o s e -induzierte Insulinsekretion haben, wurde bereits einleitend erörtert.
Bei den bisher diskutierten Stimulatoren der Insulinsekretion fällt auf, daß ihre sekretorische Wirkung von der Glucosekonzentration abhängig ist. Von der Glucosekonzentration ist aber auch der Metabolismus der Glucose abhängig. Bei gesteigertem Glucosestoffwechsel kann die Konzentration einzelner seiner Metaboliten zunehmen. Geht man davon aus, daß sich darunter Cofaktoren für die Insulinsekretion befinden, so wäre denkbar, daß durch die Zunahme der Konzentration be-

stimmter Cofaktoren auch die sekretorische Antwort der ß-Zelle gegenüber Stimulation durch Tolbutamid, Arginin, Leucin oder Aminophyllin erhöht wird. Einer der Cofaktoren aus dem Stoffwechsel der Glucose, der für die Insulin freisetzende Wirkung der G l u c o s e selbst Bedeutung hat, ist das NADPH. Es wurde daher zunächst untersucht, ob dieses auch für die Insulin freisetzende Wirkung von Tolbutamid, Arginin, Leucin oder Aminophyllin der Fall ist.
Dieser Frage kann dadurch nachgegangen werden, indem man durch Oxidation die Konzentration von NADPH in der ß-Zelle herabsetzt und prüft, ob dadurch auch eine Hemmung der durch die genannten Stimulatoren induzierten Insulinsekretion einhergeht. Als Oxidationsmittel wurde Methylenblau verwendet.

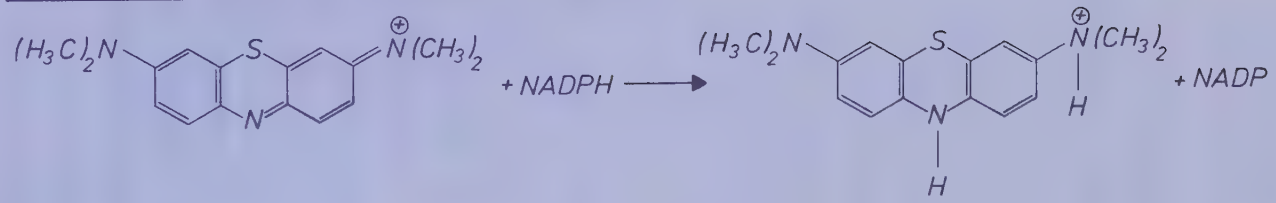
Bei jedem in Pharmakologie und Biochemie als Werkzeug verwendeten Hemmstoff stellt sich die Frage nach dessen Spezifität und Toxizität an dem zu untersuchenden Material. Über Methylenblau liegen dazu folgende Befunde vor:
Bei steigenden Methylenblau-Konzentrationen von 0,5 bis 2 µg/ml im Inkubationsmedium isolierter Pankreasinseln kommt es dosisabhängig zu einer Abnahme des NADPH/NADP-Quotienten (32). Dabei wird der intrazelluläre Gehalt an NADH nicht beeinflußt (32). Dies spricht dafür, daß Methylenblau in diesen Konzentrationen spezifisch NADPH oxidiert, nicht dagegen NADH. Jedoch sind andere bisher nicht untersuchte Effekte, die eben-

falls die Insulinfreisetzung beeinflussen könnten, nicht mit absoluter Sicherheit auszuschließen. Diese Gefahr ist jedoch bei jedem in der Pharmakologie verwendeten Stoff gegeben.
Hinsichtlich einer möglicher Toxizität gegenüber der ß-Zelle ist zu sagen, daß unter den gleichen Bedingungen keine Hemmung der Glucoseoxidation, keine Beeinflussung von ATP und den Inselgehalt sowie keine Störung des Insulinassays zu beobachten war (32). Darüber hinaus war die Hemmung der Insulinsekretion, wie am Modell des isoliert perfundierten Pankreas gezeigt wurde (73), reversibel. Diese Befunde lassen eine toxische Wirkung auf die ß-Zelle für unwahrscheinlich erscheinen.
Über die Reaktion des Methylenblau mit NADPH gibt die Abbildung 8 Auskunft.

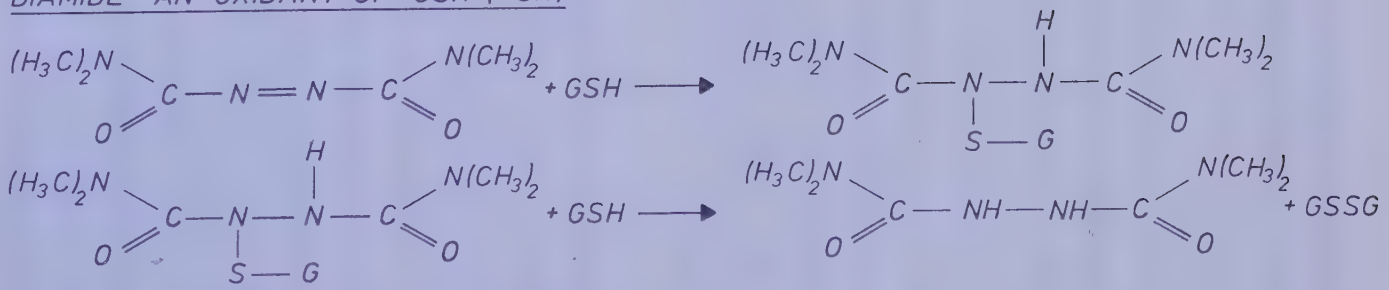
Wie aus den Tabellen 2 - 5 hervorgeht, wird sowohl die durch Glucose, als auch die durch Glucose plus Arginin, Leucin, Tolbutamid und Aminophyllin induzierte Insulinsekretion gehemmt. Dies weist darauf hin, daß der Redoxzustand des NADPH/NADP-Systems für die sekretorische Antwort der ß-Zelle gegenüber allen verwendeten Stimuli eine wichtige Rolle spielt; das heißt, daß sie die Sekretion nur stimulieren können, wenn der Quotient ein bestimmtes Niveau aufweist. Da dieser Quotient von der Glucosekonzentration abhängig ist, ergibt sich möglicherweise eine Erklärung dafür, warum die sekretions-

Abbild. 8:

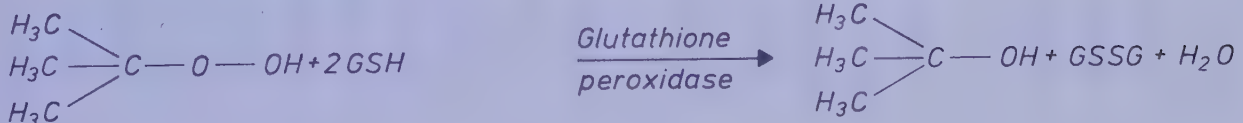
METHYLENE BLUE AN OXIDANT OF NADPH



DIAMIDE AN OXIDANT OF GSH (-SH)



t-BUTYL HYDROPEROXIDE AN INDIRECT OXIDANT OF GSH



auslösende Wirkung der untersuchten Substanzen von der Glucose abhängig ist. Von den verwendeten Stimuli wurde außer durch Glucose auch durch Leucin eine deutliche Steigerung des NADPH/NADP-Quotienten hervorgerufen (74). Es ist daher denkbar, daß Leucin durch eine eigene Steigerung dieses Quotienten selbst zu einer Stimulierung der Insulinsekretion beitragen könnte.

4. 3. Einfluß von Diamid und t-BHP auf die Sekretion von Insulin

Eine der wesentlichsten Aufgaben des NADPH im Stoffwechsel der Zelle besteht darin, oxidiertes Glutathion in den reduzierten Zustand zu überführen (75). Kürzlich wurde von Hellman et al. (52) nachgewiesen, daß p-CMB, eine Verbindung die kaum durch die Membran der ß-Zelle permeiert, zur Stimulation der Insulinsekretion führt. Diese Wirkung wurde durch Glucose verstärkt. Es wurde postuliert, daß diese Wirkung über die Reaktion mit membranständigen SH-Gruppen der ß-Zelle zustande kommt. Auch für die stimulierende Wirkung der Glucose wird die Notwendigkeit des Vorhandenseins solcher SH-Gruppen postuliert (27). Da anzunehmen ist, daß solche SH-Gruppen via SH-Gruppen aus dem Zellinnern in reduziertem Zustand gehalten werden (28), wurde jetzt geprüft, ob die stimulierende Wirkung oben benannter Stoffe auf die Insulinsekretion nicht nur vom intra-

zellulären NADPH, sondern auch vom intrazellulären GSH abhängig ist. Zu diesem Zwecke wurde ihre Wirkung auf die Sekretion von Insulin unter der Bedingung eines verminderten Gehalts an GSH in der ß-Zelle untersucht. Zur Erreichung dieses Zieles wurden als Werkzeuge Diamid und t-BHP verwendet.

Diamid ist chemisch Diazodiameisensäure-bis-(N,N-Dimethylamid). Über die Strukturformel gibt Abb. 8 Auskunft.
An anderen Geweben, wie Erythrocyten (76) und Retikulocyten (77) ist gezeigt worden, daß Diamid, das die Zellmembran passieren kann (78), sehr schnell reduziertes Glutathion zu oxidieren vermag (siehe Reaktionsgleichung der Abbildung 8). Es reagiert mit GSH spezifisch und schneller als mit anderen Molekülen in der Zelle (79). Protein-SH-Gruppen, die im allgemeinen wenig sauer und sterisch gehindert sind, dürften dabei unbeeinflußt bleiben (80). Die Substanz hat bei Untersuchungen an Erythrocyten geringe Toxizität, erst bei 50-facher stöchiometrischer Menge ist es zu Zellschädigungen gekommen (76). Erythrocyten sind in der Lage, durch Diamid oxidiertes GSH schnell wieder vollständig zu regenerieren, auch wenn Diamid in 5-facher stöchiometrischer Menge zugesetzt wurde, sofern den Zellen ausreichend Glucose zur Verfügung steht (76). Auch ist von Diamid eine Hemmung der Proteinbiosynthese beschrieben. So hemmt es

das Wachstum von E. coli (81) und die Proteinsynthese in Reticulocyten des Kaninchens (77). Diese Effekte waren aber reversibel, sobald den Zellen wieder ausreichend GSH zur Verfügung stand. Ob diese Wirkungen dem Diamid selbst oder dem durch die Oxidation des GSH entstandenen GSSG zuzuschreiben sind, ist noch ungeklärt, da beide in enger Beziehung zueinander stehen. Ob mit Diamid auch eine Synthesehemmung des Insulin einhergeht, ist unbekannt und bedarf weiterer Untersuchungen.

Was die Pankreasinsel betrifft, so liegen bisher folgende Beobachtungen vor: Diamid vermindert in den in dieser Arbeit gewählten Konzentrationen bei mit Glucose stimulierten Inseln dosisabhängig den GSH/GSSG-Quotienten (82). Seine Hemmwirkung auf die durch p-CMB beim isoliert perfundierten Pankreas ausgelöste Insulinsekretion ist reversibel (73). Dies zeigt, daß bei den in dieser Arbeit gewählten Versuchsbedingungen in der Tat der GSH-Spiegel abnimmt und die Substanz wahrscheinlich nicht zelltoxisch ist. Auch bleibt der Radioimmunoassay unbeeinflußt (vgl. S. 23).

Wie aus den Tabellen 7 - 11 hervorgeht, wird nicht nur die durch Glucose induzierte Insulinsekretion, sondern auch der stimulierende Effekt von Tolbutamid, Arginin, Leucin und Aminophyllin gehemmt.Dies läßt bereits ver-

muten, daß für alle verwendeten Stimulatoren ein gewisser Redoxzustand des GSH/GSSG-Quotienten Voraussetzung für deren stimulierende Wirkung ist.

Da mit absoluter Sicherheit dennoch unspezifische Veränderungen am Zellmaterial durch den Hemmstoff Diamid nicht auszuschließen sind, wurde eine weitere Substanz zur Senkung des GSH-Gehaltes verwendet: t-Butylhydroperoxid.
Der Wirkungsmechanismus von t-BHP auf das GSH der Zelle ist von dem des Diamid verschieden und an eine enzymatische Reaktion gebunden. t-BHP bewirkt indirekt einen Abfall von zellulärem GSH (37), indem es dem zelleigenen Enzym Glutathionperoxidase als Akzeptor dient. Hydroperoxide allgemein werden in der Zelle durch die Glutathionperoxidase in Gegenwart von GSH reduziert, GSH wird dabei in GSSG überführt (83). Die Reaktionsgleichung ist in Abb. 8 aufgeführt.
Die Glutathionperoxidase ist gekennzeichnet durch geringe Selektivität des Akzeptorhydroperoxids und durch sehr hohe Spezifität des Donorsubstrates GSH (83). Ein Überschuß an t-BHP führt wegen der Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts nach rechts zu einem Abfall des reduzierten Glutathions und Bildung von GSSG in der Zelle, wie es auch in Erythrocyten (37) und in der Leber (84) beobachtet wurde. Daß es sich dabei nicht um chemische

Veränderungen des Glutathionmoleküls oder irreversible Noxen handelt, konnte nachgewiesen werden, indem t-BHP-behandelte, GSH-verarmte Erythrocyten nach Inkubation in glucosehaltigem Milieu innerhalb weniger Minuten wieder alles GSH regenerierten (37). Solche Erythrocyten, bei denen genetisch bedingt G-6-P-DH nicht in vollem Umfang zur Verfügung stand, konnten dies nicht, da in diesem Fall über den PPS nicht ausreichend NADPH gebildet wird (37). Ähnliche reversible Wirkungen konnten auch an der perfundierten Leber gezeigt werden (84).

Für die Pankreasinsel liegen folgende Befunde vor: t-BHP senkt dosisabhängig des GSH/GSSG-Quotienten isolierter Pankreasinseln in den in dieser Arbeit angewandten Konzentrationen (85). Bei p-CMB als Stimulator der Insulinsekretion war seine hemmende Wirkung auf den Sekretionsvorgang am isoliert perfundierten Organ reversibel (73). t-BHP dürfte daher - mit allen Einschränkungen, die man bei Hemmstoffen machen muß - im angewandten Bereich relativ spezifisch und untoxisch für die ß-Zelle sein.

Wie aus den Tabellen 12 - 17 hervorgeht, wird durch t-BHP der sekretorische Effekt der Glucose sowie von Tolbutamid, Arginin, Leucin und Aminophyllin deutlich gehemmt. Diese Befunde sind somit ähnlich den mit Diamid erhobenen und stützen somit ebenfalls die These, daß ein

bestimmter Rodixzustand des insulären GSH/GSSG-Systems Voraussetzung für die Insulin freisetzende Wirkung dieser Stoffe - unabhängig von der Art ihrer Signalwirkung- ist.

Versucht man unter Berücksichtigung der bereits vorhandenen Literatur und der in dieser Arbeit erhobenen Befunde letztere in ein gewisses Konzept zu bringen, so ist festzuhalten:
Alle untersuchten Substanzen haben folgendes gemeinsam: ihre sekretorsiche Funktion hängt von der Höhe des NADPH/NADP-Quotienten und des GSH/GSSG-Quotienten ab, wobei beide miteinander auch in der Insel im Gleichgewicht stehen dürften (28). Von den untersuchten Stoffen führen nur Glucose und Leucin zu einer Zunahme dieser Quotienten, bei ersterem dosisabhängig von 1 bis 3 mg/ml Glucose im Inkubationsmedium (86). Die stimulierende Wirkung von Tolbutamid, Arginin,und Aminophyllin nimmt mit zunehmender Glucosekonzentration innerhalb eines gewissen Bereichs (etwa zwischen 1 und 2 mg/ml) zu.
Alle untersuchten Substanzen unterscheiden sich jedoch voneinander dadurch, daß sie das Signal zur Insulinfreisetzung auf unterschiedliche Weise geben; sie verfügen aber über einen gemeinsamen Abschnitt in der Sequenz der Ereignisse, die schließlich zur Sekretion von Insulin führen, nämlich im Bereich des NADPH - GSH.

Dies macht möglicherweise verständlich, warum die Wirkung der meisten Stimulatoren (Ausnahme Leucin) von der Glucosekonzentration abhängig ist. Geht man von einer solchen Annahme aus, dann wäre es denkbar, daß über den Stoffwechsel der Glucose, der ja konzentrationsabhängig ist, die stimulierende Wirkung der Glucose selbst, aber auch die von Tolbutamid, Arginin, oder Aminophyllin via NADPH ⟶ GSH moduliert wird.

Daß eine solche Modulierung von physiologischer Relevanz sein kann, lassen neuere Befunde aus diesem Labor vermuten: Exogenes Insulin senkt dosisabhängig den insulären NADPH/NADP-Quotienten, aber nur bei Anwesenheit von Glucosekonzentrationen, die über 1 mg/ml liegen. Damit einher geht eine Hemmung der durch Glucose induzierbaren Insulinsekretion. Man kann also vermuten - auch nach den Ergebnissen dieser Arbeit -, daß die Hemmung der Insulinsekretion die Folge der Senkung des NADPH/NADP-Quotienten ist (48). Untersuchungen mit exogenem Insulin unter Verwendung von p-CMB, Tolbutamid, Arginin, Leucin oder Aminophyllin als Stimulatoren ergaben, daß dieses auch deren Insulinfreisetzende Wirkung hemmen konnte. Dies mag bedeuten, daß exogenes Insulin via NADP ⟶ GSSG die Ansprechbarkeit der ß-Zelle gegenüber unterschiedlichen Stimulatoren moduliert und auf diese Weise verhindert, daß durch extreme Sekretion von Insulin die Gefahr einer Hyperglycämie entsteht.

Wie könnte so eine Modulierung durch Glucose bzw. exogenes Insulin rein hypothetisch aussehen?
Die Permeabilität von Zellmembranen für Ionen (87, 88) hängt vom Redoxzustand der SH-Gruppen der Membran ab. Im Ruhezustand der ß-Zelle dürfte das Redoxgleichgewicht der Membran-Thiol-Gruppen mehr auf die oxidierte Seite verschoben sein, wodurch Ionenfluxe durch die Membran, die bei einem Erregungszustand schließlich zur Sekretion von Insulin führen, verhindert werden. Durch Glucose könnte via NADPH → GSH → SH-Gruppen in der Membran das Redoxgleichgewicht mehr auf die reduzierte Seite verschoben sein, wodurch ein durch ein Signal ausgelöster Ionenflux den Sekretionsvorgang auslösen könnte. Auf der anderen Seite könnte exogenes Insulin via Bildung von NADP → GSSG → S-S-Gruppen der Membran letztere gegen Ionenflüsse stabilisieren.
In anderen Worten: Über den Redoxzustand des NADPH - GSH-Systems, der maßgeblich von der Glucosekonzentration einerseits, von der Konzentration an sezerniertem Insulin andererseits abhängt, kann die Ansprechbarkeit der ß-Zelle gegenüber den von uns untersuchten Stimulatoren der Insulinsekretion, wie Glucose, Tolbutamid, Arginin, Leucin und Aminophyllin, moduliert werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

5.1. In der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob eine gezielte Senkung des Gehaltes an NADPH und GSH in der Langerhans'schen Insel der Ratte zu verminderter Insulinsekretion, ausgelöst durch die Stimulatoren Glucose, Tolbutamid, Arginin, Leucin und Aminophyllin, führt.

5.2. Dabei wurden folgende Hemmstoffe eingesetzt:
Methylenblau, das den Gehalt der Inselzelle an NADPH durch Oxidation herabsetzt,
Diamid, ein Oxidationsmittel für reduziertes Glutathion,
t-Butylhydroperoxid, ein Substrat der Glutathionperoxidase, das über eine enzymatische Reaktion den GSH-Gehalt erniedrigt.
Dabei ergab sich:

5.3. Methylenblau konnte die durch Glucose, Glucose und Tolbutamid, Arginin, Leucin oder Aminophyllin ausgelöste Sekretion von Insulin deutlich herabsetzen.

5.4. Ein erniedrigter Gehalt der ß-Zelle, hervorgerufen durch Diamid, führte bei Glucose dosisabhängig zu

einer Hemmung der Insulinsekretion. Bei den Kombinationen Glucose und Tolbutamid, Arginin, Leucin oder Aminophyllin wurde durch Diamid eine signifikante Abnahme der Sekretion von Insulin beobachtet.

5.5. Der Zusatz von t-BHP zu Langerhans'schen Inseln führte bei allen verwendeten Stimulatoren zu einer verminderten Insulinsekretion.

5.6. Die Ergebnisse lassen vermuten, daß ein ausreichender Gehalt an NADPH in der ß-Zelle für die stimulierende Wirkung oben genannter Stoffe Voraussetzung ist.

5.7. Weiterhin dürfte für die sekretorische Fähigkeit aller untersuchten Stimulatoren der Insulinsekretion auch ein genügend hoher GSH-Gehalt in der ß-Zelle notwendig sein.

5.8. Obwohl Glucose, Tolbutamid, Arginin, Leucin und Aminophyllin das Signal zur Insulinsekretion auf unterschiedliche Weise geben, dürften in der Kette der Ereignisse, die im Mechanismus der Insulinsekretion schließlich zur Emiocytose Insulin enthaltender Granula führt, alle unter-

suchten Stimulatoren NADPH und GSH als gemeinsame Glieder haben.

5.9. Die Möglichkeit, daß der Redoxzustand solcher SH-Gruppen der ß-Zellmembran, die für die Erkennung und Weiterverarbeitung von sekretionsauslösenden Signalen von Bedeutung sind, via NADPH - GSH moduliert werden kann, wird diskutiert.

Literaturverzeichnis

1) Hales, C.N., Milner, R.D.G.:
The role of sodium and potassium in insulin secretion from rabbit pancreas.
J. Physiol.(London) 194, 725 (1968)

2) Milner, R.D.G., Hales, C.N.:
The role of calcium and magnesium in insulin secretion from rabbit pancreas studied in vitro.
Diabetologia 3, 47-49 (1967)

3) Malaisse, W.J.:
Etude de la sécrétion insulinique in vitro.
Paris: Maloine (1969)

4) Grodsky, G.M., Batts, A.A., Bennet, L.L., Vcella, C., McWilliams, N.B. Smith, D.F.:
Effects of Carbohydrates on secretion of insulin from isolated rat pancreas.
Am. J. Physiol. 205,(4), 638-644 (1963)

5) Hellman, B.:
Methodological approaches to studies on the pancreatic islets.
Diabetologia 6, 110 (1970)

6) Ashcroft, S.J.H., Basset, J.M., Randle, P.J.:
Insulin secretion mechanism and glucose metabolism in isolated islets.
Diabetes 21, 538-545 (1972)

7) Matschinsky, F.M., Landgraf, R., Ellerman, J., Kotler-Brajtburg, J.:
Glucoreceptor mechanism in islets of Langerhans.
Diabetes 21, 555-569 (1972)

8) Coore, H.G., Randle, P.J.:
Regulation of insulin secretion, studied with pieces of rabbit pancreas incubated in vitro.
Biochem. J. 93, 66-78 (1964)

9) Lambert, A.E.:
The regulation of insulin secretion.
Physiol. Bio. Pharmacol 75, 97 (1976)

10) Hellman, B., Idahl, L.A., Lernmark, A., Sehlin, J., Täljedal, I.B.:
The pancreatic ß-cell recognition of insulin secretagogues. VII. Comparisons of glucose with glyceraldehyde isomers and dihydroxyacetone.
Arch. Biochem. Biophys. 162, 448-457 (1974)

11) Sudgen, M.C., Ashcroft, S.J.H.:
Phosphoenolpyruvate in Rat Pancreatic Islets: a Possible Intracellular Trigger of Insulin Release?
Diabetologia 13, 481-486 (1977)

12) Matschinsky, F.M., Ellerman, J.:
Dissociation of the insulin releasing and the metabolic functions of hexoses in islets of Langerhans.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 50, 193-198 (1973)

13) Sehlin, J.:
Effects of mannoheptulose on the dynamics of glucose oxidation in the pancreatic ß-cells.
FEBS Letters 30, 45-48 (1973)

14) Hellman, B., Lernmark, A., Sehlin, J., Täljedal, I.B.:
The pancreatic ß-cell recognition of insulin secretagogues. V. Binding and stimulatory action of phlorizin.
Mol. Pharmacol. 8, 759-769 (1972)

15) Beckmann, J., Holze, S., Joost, H.G., Weisker, T.:
The insulinotropic action of L-glucose.
Abstract, Pharmacology Meeting Hannover 1976

16) Hellman, B., Lernmark, A., Sehlin, I., Täljedal. I.B.:
Effects of phlorizin on metabolism and function of pancreatic ß-cell.
Metab. Clin. Exp. 21, 60-66 (1972)

17) Montague, W., Taylor, K,W.:
The role of the pentose phosphate pathway in insulin secretion in the structure and metabolism of pancreatic islets.
Pergamon Press, Oxford, 263-274 (1970)

18) Heinze, E., Steinke, J.:
Glucose metabolism of isolatied pancreatic islets: Difference between fetal, newborn and adult rats.
Endocrin. 88, 1259-1263 (1971)

19) Ammon, H.P.T., Steinke, J.:
6-Aminonicotinamide (6-AN) as a diabetogenic agent; In vitro and in vivo studies in rats.
Diabetes 21, 143-148 (1972)

20) Allen, D.W., Jandl, J.H.:
Oxidative haemolysis and precipitation of hemoglobin. II. Role of thiols in oxidant drug action.
J. Clin. Invest. 40, 454 (1961)

21) Harley, J.D., Robin, H., Menser, M.A., Hertzberg, R.:
Cataracts in glucose - 6- phosphate dehydrogenase deficiency.
Brit. med. J. 1, 421 (1966)

22) Meister, A.:
On the enzymology of amino acid transport.
Science 180, 33 (1973)

23) Kosower, E.M.:
A role for glutathione in muscle contraction.
Experientia 26, 760 (1970)

24) Bartels-Bernal, E., Rosenberry, T.L., Chang, H.W.:
A membrane activation cycle by sulfhydryl reagents after affinity labeling of the acetylcholine receptor of electroplax.
Mol. Pharmacol. 12, 813 - 819 (1976)

25) Bloom, G.D., Hellman, B., Idahl, L.A., Lernmark, A., Sehlin, J., Täljedal, I.B.:
Effects of organic mercurials on mammalian pancreatic ß-cells. Insulin release, glucose transport, glucose oxidation, membrane permeability and ultrastructure.
Biochem. J. 129, 241-254 (1972)

26) Rink, H.:
Thiol compounds in radiation biology.
in: Glutathione proceedings of the 16th Conference of the German Society of Biological Chemistry.
(Flohé, L., Benöhr, H., Sies, H., Waller, H.D., Wendel, A., eds.)
p. 206, Thieme, Stuttgart (1974)

27) Pagliara, A.S., Hover, B.A., Ellerman, J., Matschinsky, F.M.:
Iodoacetate and Iodoacetamide-induced alterations of pancreatic- and ß-cell responses.
Endocrin. 97, 698-708 (1975)

28) Ammon, H.P.T., Akhtar, M.S., Niklas, H., Hegner, D.:
Inhibition of p-Chloromercuribenzoate- and Glucose-induced Insulin Release in Vitro by Methylene Blue, Diamide, and tert-Butyl Hydroperoxide.
Mol. Pharmacol. 13, 598-605 (1977)

29) Umbreit, W.W., Burris, R.H., Stauffer, J.P.:
Manometric and biochemical techniques.
5th Edition, Burgess Publishing Co., Minneapolis, Minnesota, U.S.A., p. 146 (1972)

30) Lacy, P.E., Kostianovsky, M.:
Method for isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas.
Diabetes 16, 35-39 (1967)

31) Soeldner, J.S., Slone, D.:
Critical variables in the radioimmunoassay of serum insulin using the double antibody technique.
Diabetes 14, 771-779 (1965)

32) Ammon, H.P.T., Patel, T.N., Steinke, J.:
The role of the PPS in glucose-induced insulin release: in vitro studies with 6-Aminonicotinamide, Methylene Blue, NAD^+, NADH, $NADP^+$, NADPH and nicotinamide on isolated pancreatic rat islets.
Biochim. Biophys. Acta 297, 352-367 (1973)

33) Curry, D.L.:
Glucagon potentiation of insulin secretion by the perfused rat pancreas.
Diabetes 19, 420-428 (1976)

34) Loubatières, A.L., Mariani, M.M., Chapal, J.:
Insulin-sécrétion etudiée sur le pancreas isolé et perfusé du rat. I. Synergie entre glucose et sulfamides hypoglycémiants.
Diabetologia 6, 457-466 (1970)

35) Ammon, H.P.T., Steinke, J.:
Effect of 6-aminonicotinamide on insulin release and C-14 glucose oxidation by isolated pancreatic rat islets: Difference between glucose, tolbutamide and aminophylline.
Endocrin. 91, 33-38 (1972)

36) Montague, W., Cook, J.R.:
Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate and insulin release.
Biochem. J. 120, 9-10 (1970)

37) Srivastava, S.K., Awasthi, Y.C., Beutler, E.:
Useful agents for the study of glutathione metabolism in erythrocytes.
Biochem. J. 139 (1974)

38) Malaisse, W.J., Malaisse-Lagae, F., Mahy, M., Brisson, G.R.:
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. VIII. Combined effects of glucose and sulfonylureas.
Europ. J. clin. Invest. 2, 85-90 (1972)

39) Milner, R.D.G., Hales, C.N.:
The interaction of various inhibitors and stimuli of insulin release studied with rabbit pancreas.
Biochem. J. 113, 473-479 (1969)

40) Ammon, H.P.T.:
Effect of Tolbutamide on Aminophylline-, 3,5-AMP-Dibutyrate- or Glucagon-Induced Insulin Release from Pancreatic Islets after Impairment of Pyridine Nucleotide Metabolism Caused by 6-Aminonicotinamide (6-AN).
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 290, 251-264 (1975)

41) Ashcroft, S.J.H., Weerasinghe, L.C.C., Basset, J.M., Randle, P.J.:
The pentose cycle and insulin release in mouse pancreatic islets.
Biochem. J. 126, 525-532 (1972)

42) Hellman, B., Idahl, L.A., Danielsson, A.:
Adenosine triphosphate level of mammalian pancreatic B cells after stimulation with glucose and hypoglycemic sulfonylureas.
Diabetes 18, 509-516 (1969)

43) Montague, W., Taylor, K.W.:
Islet-cell metabolism during insulin release. Effects of glucose, citrate, octanoate, tolbutamide, glucagon and theophylline.
Biochem. J. 115, 257-262 (1969)

44) Ashcroft, S.H.J., Randle, P.J.:
Enzymes of glucose metabolism in normal mouse pancreatic islets.
Biochem. J.119, 5-15 (1970)

45) Hellman, B., Täljedal, I.B.:
Effects of Sulfonylurea Derivates on Pancreatic ß-Cells; in:
Handbood of Experimental Pharmacology,
Springer, New York 1975

46) Ashcroft, S.H.J., Weerasinghe, L.L.C., Randle, P.J.:
Interrelationships of islet metabolism, ATP content and insulin release.
Biochem. J. 132, 223-231 (1973)

47) Stork, H., Schmidt, F.H., Westman, S., Hellerström,C.:
Action of some hypoglycaemic sulfonylureas on the oxygen consumption of isolated pancreatic islets of mice.
Diabetologia 5, 279-283 (1969)

48) Ammon, H.P.T., Verspohl, E.:
Pyridine Nucleotides in Pancreatic Islets During Inhibition of Insulin Release by Exogenous Insulin.
Endocrin. 6, 1469-1476 (1976)

49) Sams, D.J., Montague, W.:
The role of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate in the regulation of insulin release. Properties of islet-cell adenosine 3':5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase.
Biochem. J. 129, 945-952 (1972)

50) Charles, M.A., Lawecki, J., Steiner, A.L., Grodsky,G.:
Cyclic Nucleotides in Pancreatic Islets.
Tolbutamide- and Arginine-induced Insulin Release.
Diabetes 25, 256-259 (1976)

51) Kuo, W.N., Hodgins, D.S., Kuo, J.F.:
Adenylate cyclase in islets of Langerhans. Isolation of islets and regulation of adenylate cyclase activity in various hormones and agents.
J. Biol. Chem. 248, 2705-2711 (1973)

52) Hellman, B., Idahl, L.A., Lernmark, A., Sehlin, J., Täljedal, I.B.:
Membrane Sulfhydryl Groups and the pancreatic ß-cell recognition of insulin secretagogues.
In Diabetes (Malaisse, W.J., Pirart, J. eds.)
pp 65-78, Excerpta Medica Foundation, Amsterdam (1974)

53) Hellman, B., Sehlin, J., Täljedal, I.B.:
The pancreatic ß-cell recognition of insulin secretagogues. II. Site of action of tolbutamide.
Biochem. Biophysl Res. Comm. 45, 1384-1388 (1971)

54) Basabe, J.C., Lopez, N.L., Viktora, J.K., Wolff, F.W.:
Insulin secretion studied in the perfused rat pancreas. I. Effect of tolbutamide, leucine and arginine; their interaction with diazoxide, and relation to glucose.
Diabetes 20, 449-456 (1971)

55) Malaisse, W.J., Malaisse-Lagae, F.:
Stimulation of insulin secretion by noncarbohydrate metabolites.
J. Lab. clin. Med. 72, 438-448 (1968)

56) Levin, S.R., Grodsky, G.M., Hagura, R., Smith, D.F., Forsham, R.H.:
Relationships between arginine and glucose in the induction of insulin secretion from the isolated, perfused rat pancreas.
Endocrin. 90, 624-631 (1972)

57) Lernmark, A.:
Specifity of leucine stimulation of insulin release.
Hormones 3, 14-21 (1972)

58) Hellman, B., Sehlin, J., Täljedal, I.B.:
Effects of glucose and other modifiers of insulin release on the oxidative metabolism of amino acids in micro-dissected pancreatic islets.
Biochem. J. 123, 513-521 (1971)

59) Panten, U., Christians, J.:
Effects of aminonorbornane-2-carboxylic acid upon insulin secretion and fluorescence of reduced pyridine nucleotides of isolated perifused pancreatic islets.
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmac.exp.Path. 276 55-62 (1973)

60) Akhtar, M.S., Hoppe, E., Niklas, H., Ammon, H.P.T.:
Effect of Leucine and Arginine on Islet pyridine Nucleotide Contents and Insulin Release; In Vitro Interactions with Methylene Blue, Thiol Oxidants and p-Chloromercuribenzoate.
Manuskript in Vorbereitung

61) Fajans, S.S.R., Quibrera, S., Pek J., Floyd, H.N., Christensen H., Conn, J.W.:
Stimulation of insulin release in the dog by a non-metabolizable amino acid: Comparison with leucine and arginine.
J. Clin. Endocrin. Metab. 33, 35 (1971)

62) Milner, R.D.G.:
The mechanism by which Leucine and Arginine stimulate insulin release in vitro.
Biochim. Biophys. Acta 192, 154-56 (1969)

63) Efendic, S., Cerasi, E., Luft, R.:
Arginine-induced Insulin Release in Relation to the Cyclic AMP System in Man.
J. Clin. Endocrin. Metab. 34, 67-72 (1972)

64) Fajans, S.S., Floyd, J.C., Knopf, R.F., Pek, S., Quibrera, R., Conn, J.W.:
Effects of amino acids on insulin release in vivo.
In: 7th Congress of the International Diabetes Federation, Buenos Aires, pp 123-136.
Amsterdam: Excerpta Medica (1971)

65) Hellman, B., Sehlin, J., Täljedal, I.B.:
Effects of glucose and other modifiers of insulin release on the oxidative metabolism of amino acids in micro-dissected pancreatic islets.
Biochem. J. 125, 513-521 (1971)

66) Panten, U., Kriegstein, E.v., Poser, W., Schönborn, J., Hasselblatt, A.:
Effects of L-leucine and α-ketoisocaproic acid upon insulin secretion and metabolism of isolated pancreatic islets.
FEBS Letters 20, 225-228 (1972)

67) Atkins, T., Matty, A.J.:
Adenyl cyclase and Phosphodiesterase activity in the isolated islets of Langerhans of obese mice and their lean litter mates: The effect of glucose, adrenaline and drugs on Adenylcyclase activity.
J. Endocrin. 51, 67-78 (1971)

68) Bowen, V., Lazarus, N.R.:
Glucose-mediated insulin release from mouse islets of Langerhans: cyclic nucleotide phosphodiesterase.
Biochem. J. 128, 97 (1972)

69) Montague, W., Cook, J.R.:
The role of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate in the regulation of insulin release by isolated rat islets of Langerhans.
Biochem. J. 122, 115-120 (1971)

70) Charles, M.A., Fanska, R., Schmid, F.G., Forsham, P.H., Grodsky, G.M.:
Adenosine 3',5'-monophosphate in pancreatic islets: Glucose-induced insulin release.
Science 179, 569-571 (1973)

71) Malaisse-Lagae, F., Malaisse, W.J.:
Stimulus-secretion coupling of glucose-induced Insulin release. III. Uptake of ^{45}calcium by isolated islets of Langerhans.
Endocrin. 88, 72-80 (1971)

72) Lacy, P.E.:
Beta cell secretion - from the standpoint of a pathobiologist.
Diabetes 19, 895-905 (1970)

73) Akhtar, M.S.:
Untersuchungen zum Mechanismus der Insulinsekretion: Bedeutung von Thiol-Gruppen in der ß-Zelle der Langerhans'schen Insel für die Freisetzung von Insulin und ihre mögliche Bedeutung zum Mechanismus der Feedback-Hemmung der Insulinsekretion.
Dissertation, München 1977

74) Ammon, H.P.T., Hoppe, E.:
Einfluß von Leucin auf den NADPH/NADP-Quotienten isolierter Pankreasinseln der Ratte.
Abstract, 11. Jahrestag der Deutschen Diabetes-Gesellschaft Braunlage, 27.-29.5.1976

75) Rall, I.W., Lehninger, A.L.:
Glutathione reductase of animal tissues.
J. Biol. Chem. 194, 119-130 (1952)

76) Kosower, N.S., Kosower, E.M., Wertheim, B.:
Diamide, a new reagent for the intracellular oxidation of Glutatione to the disulfide.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 37, 593-596 (1969)

77) Zehavi-Willner, T., Kosower, E.M., Hunt, T., Kosower, N.S.:
Glutathione V. The effects of the thiol-oxidizing agent diamide on initiation and translation in rabbit reticulocytes.
Biochim. Biophys. Acta 228, 245 (1971)

78) Brown, J.S.:
Oxidation of reduced Nicotinamide nucleotides by diamide.
Biochem. J. 124, 665-667 (1971)

79) Kosower, E.M., Correa, W., Kinon, B.J.:
Glutathione VII. Differentiation among substrates by the thiol-oxidizing agent, diamide.
Biochim. Biophys. Acta 264, 39-44 (1972)

80) Kosower, E.M., Kosower, N.S.:
Manifestations of Changes in the GSH-GSSG Status of Biological Systems.
in: Glutathione proceedings of the 16th Conference of the German Society of Biological Chemistry.
(Flohé, L., Benöhr, H., Sies, H., Waller, H.D., Wendel, A., eds.)
p. 287, Thieme, Stuttgart (1974)

81) Wax, R., Rosenberg, E., Kosower, N.S., Kosower, E.M.:
The effect of the thiol-oxidizing agent, diamide, on the growth of Escherichia Coli.
J. Bacteriol. 101, 1092 (1970)

82) Ammon, H.P.T., Wagner-Teschner, D., Grimm, A., Niklas, H.:
Relationship between NADPH, Glutathione and glucose-induced Insulin Secretion in Pancreatic Rat Islets.
Abstract, Joint Meeting of German and Italian Pharmacologists, Oct. 1977, Venezia

83) Flohé, L.:
Die Glutathionperoxidase: Enzymologie und biologische Aspekte.
Klin. Wochenschrift 49 (1971)

84) Sies, H., Gerstenecker, C., Summer, K.H., Menzel, H., Flohé, L.:
Glutathione-dependent Hydroperoxide Metabolism and Associated Metabolic Transitions in Hemoglobin-free Perfused Rat Liver.
In: Glutathione proceedings of the 16th Conference of the German Society of Biological Chemistry.
(Flohé, L., Benöhr, H., Sies, H., Waller, H.D., Wendel, A., eds.)
p. 261, Thieme, Stuttgart (1974)

85) Grimm, A.:
unveröffentl. Mitteilungen

86) Hoppe, E.:
unveröffentl. Mitteilungen

87) Matthews, E.K., Dean, P.M.:
Electrical activity in islet cells.
In: The Structure and Metabolism of the Pancreatic Islets, Vol. 2, pp. 305-313
(Falkmer, S., Hellman, B., Täljedal, I.B. eds.)
Pergamon Press, Oxford (1970)

88) Schwartz, I.L., Rasmussen, H., Schoessler, H., Silver, M.A., Fong, C.T.O.:
Relation of chemical attachment to physiological action of vasopressin.
Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A. 46, 1288 (1960)

Lebenslauf

Am 28. Mai 1948 wurde ich, Herbert Niklas, als Sohn des Bäckers Emil Niklas und seiner Ehefrau Philomena, geb. Fäßler, in Augsburg geboren.
Von 1954 - 1959 besuchte ich die Volksschule in Augsburg und wechselte anschließend an das Jakob-Fugger-Wirtschafts-gymnasium, an dem ich 1968 die Reifeprüfung ablegte.
Im Oktober 1968 begann ich meine Ausbildung als Apotheker-praktikant in der St.-Georg-Apotheke in Augsburg, die ich im September 1970 mit dem Vorexamen abschloß.
Einer halbjährigen Tätigkeit in einer Apotheke schloß sich im April 1971 das Studium der Pharmazie in Tübingen an, das ich im April 1974 mit der Pharmazeutischen Prüfung beendete.
Nach vorübergehender Tätigkeit in einer Apotheke begann ich im Oktober 1974 bei Herrn Prof. Dr. H.P.T. Ammon in der Abteilung Pharmakologie des Pharmazeutischen Instituts der Eberhard-Karls-Universität Tübingen mit der Dissertation "Einfluß von Methylenblau, Diamid und t-Butylhydroperoxid auf die Sekretion von Insulin aus isolierten Langerhans'schen Inseln des Rattenpankreas. Ein Beitrag zur Erkennung der Bedeutung von NADPH und reduziertem Glutathion für den Sekretionsmechanismus", die ich im Mai 1978 abschloß.
Seit Oktober 1974 bin ich als wissenschaftliche Hilfs-kraft am Pharmazeutischen Institut tätig.
Am 20. April 1976 heiratete ich die Studienreferendarin Barbara Schmid aus Augsburg.

Meine akademischen Lehrer außer

Herrn Prof. Dr. H.P.T. Ammon waren die Herren

Professoren und Dozenten

H. Auterhoff, E. Graf, K.-A. Kovar, F. Moll (Pharmazie),

E. Reinhard (Pharm. Biologie)

E. Müller (Chemie)

R. E. Bader (Bakteriologie und Hygiene)

H. Krüger (Physik)

M. Siess (Pharmakologie)